



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO de CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Modulación del sistema de defensas antiherbívoro en  
Solanum lycopersicum por señales lumínicas de  
competencia percibidas por el fitocromo.***

---

**Tesista: Lic. Leandro Emanuel Cortés**

**Director: Dr. Hernán Esteban Boccalandro (2010-2012)**

**Director: Dr. Carlos Luis Ballaré (2012-2018)**

**Codirectora: Dra. Patricia Noemí Piccoli (2012-2018)**

**Año: 2018**



## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Carlos L. Ballaré**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Oregon State University, U.S.A)

**Hernán E. Boccalandro**

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

Co-directo de tesis

**Patricia N. Piccoli**

Licenciada en Microbiología (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Doctora (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Asesor académico

**María Laura García**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de La Plata)

Doctora (Universidad Nacional de La Plata)

## JURADOS

**Héctor D. Bertero**

Licenciado en Biología (Universidad Nacional de Córdoba)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

**María Agustina Mazzella**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora (Universidad de Buenos Aires)

**María Gabriela Luna**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de La Plata)

Doctora (Universidad Nacional de La Plata)

Fecha de defensa de la tesis: 19 de Octubre de 2018.



## **AGRADECIMIENTOS**

-A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, la ANPCYT y al CONICET por permitirme estudiar y desarrollar este doctorado.

-Al IBAM por haberme otorgado un lugar para el desarrollo de este trabajo y por permitirme formar parte de este grupo.

Asimismo quiero agradecer en particular:

-A Hernán, por haber confiado en mí y aceptado ser director de este trabajo. Por haberme introducido en el mundo de la fotobiología.

- Al Dr. Carlos Ballaré y la Dra. Patricia Píccoli, por darme la oportunidad de continuar y guiarme en los momentos más difíciles. Por el tiempo y esfuerzo que dedicaron para que se pueda concretar esta tesis.

- A la Dra. María Laura García, por ayudarme y estar siempre presente.

- A la Dra. Patricia Fernández por su ayuda con los VOC y su constante e incondicional apoyo.

-A la Dra. Miriam Izaguirre y al Dr. Carlos Mazza por su ayuda y apoyo.

- Al Laboratorio de Entomología de la Universidad de Wageningen, especialmente al Dr. Marcel Dicke y al Dr. Diego Bastos Silva.

- A Daniel Bari y Silvina Lassa del MEBYM.

- A la Dra. Gabriela Luna y la Dra. Eliana Nieves del CEPAVE.

- A la banda del IBAM, en especial a Juan Pa, El Vasco, Ale, Coti, Estefi, Romi, Cintia, Laura, Caro, Ingrid, Magda y Mari.

- Al IFEVA y al Grupo de UV, en especial a Nacho y Patricia.

- A los Buenos Muchachos, Isma, Peluca, Sisso, Fede, Lucho y Claudio

- A mis amigos, en especial a los Bilbao's, los Foche's y los Pastore's

- A la familia Carbonero

- A Goldi y German.

Un agradecimiento especial a mi familia que incondicionalmente siempre está presente, en las buenas y en las malas; llueva, nieve o truene: mis viejos, mis hermanos, mis sobrinos y mis abuelos. A mi esposa y a mi hija, July y Berni por acompañarme día a día en esta aventura, apoyarme y nunca dejarme bajar los brazos.



A Hernán,  
El *Voyeurista* vegetal





## **Modulación del sistema de defensas antiherbívoro en *Solanum lycopersicum* por señales lumínicas de competencia percibidas por el fitocromo.**

### **RESUMEN**

La competencia y la herbivoría son dos fuerzas selectivas en la evolución de las plantas terrestres. Éstas deben crecer lo suficientemente rápido como para ser competitivas con sus vecinos y, al mismo tiempo, asignar recursos a las defensas para poder sobrevivir a los organismos consumidores. Estudios recientes mostraron que las señales lumínicas asociadas a la competencia, p. ej. una baja relación rojo:rojo lejano (R:RL) produce la represión del sistema de defensas, tornando a las plantas más susceptibles al ataque de insectos herbívoros y microorganismos patógenos. Bajo condiciones de competencia por luz, se produce la inactivación del fitocromo B (phyB) lo cual en plantas intolerantes a la sombra promueve el crecimiento y regula negativamente los sistemas de defensa antiherbívoro. Poco se sabe sobre los efectos que tiene el phyB en la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) involucrados en las defensas indirectas.

En esta tesis se investigó el efecto de phyB en las defensas directas e indirectas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Para esto se utilizaron dos aproximaciones diferentes para inactivar el phyB: suplementación con luz rojo lejano (RL), y genotipos mutantes de los dos genes *PHYB* presentes en el genoma de tomate. La inactivación del phyB produjo una disminución en los niveles de defensas constitutivas como así también una atenuación de las defensas directas inducibles por MeJA. Adicionalmente, se observó que la inactivación de phyB tuvo efectos en los *blends* de VOCs emitidos por las plantas inducidas con MeJA. En ensayos de elección en olfatómetro con plantas inducidas con MeJA observamos que la chinche *Macrolophus pygmaeus* tuvo mayor preferencia por los *blends* de VOCs emitidos por plantas con phyB inactivos que por los *blends* de las *wild-type*.

Estos resultados sugieren que la inactivación del phyB además de reprimir las defensas directas tiene consecuencias sobre las interacciones tritróficas mediadas por VOCs presumiblemente atrayendo a los predadores a plantas con defensas atenuadas donde existe mayor chance de encontrar a su presa. Es tentador pensar que las plantas bajo un stress de competencia por luz puedan hacer un *switch* entre sus defensas directas a indirectas y así atraer a enemigos naturales.



## ***Modulation of *Solanum lycopersicum* antiherbivore defenses by phytochrome B perceived light signals***

### **ABSTRACT**

*Competition and herbivory are two selective forces in the evolution of plants. Plants have to grow fast enough to be competitive with their neighbors and, at the same time, allocate resources to defenses to survive in environments where consumer organisms are present. Recent studies showed that the light signals associated with competition, (low red:far-red ratios (R: FR)) act as negative regulators of plant immunity, rendering the plants more susceptible to herbivorous insects and pathogen attack. Under conditions of competition for light, which lead to the inactivation of the photoreceptor phytochrome B (phyB), the growth of shade-intolerant plants is promoted and the accumulation of direct anti-herbivore defenses is down-regulated. Nowadays, little is known about the effects of phyB on emissions of volatile organic compounds (VOCs), which play a major role as informational cues in indirect defense.*

*In this thesis the effects of phyB on direct and indirect defenses in tomato (*Solanum lycopersicum*) was investigated using two complementary approaches to inactivate phyB: illumination with a low red to far-red ratio, simulating competition, and mutation of the two PHYB genes present in the tomato genome. Inactivation of phyB resulted in low levels of constitutive defenses and down-regulation of direct defenses induced by methyl jasmonate (MeJA). Interestingly, phyB inactivation also had large effects on the blends of VOCs induced by MeJA. Moreover, in two-choice bioassays using MeJA-induced plants, the predatory mirid bug *Macrolophus pygmaeus* preferred VOCs from plants in which phyB was inactivated over VOCs from control plants.*

*These results suggest that, in addition to repressing direct defense, phyB inactivation has consequences for VOC-mediated tritrophic interactions in canopies, presumably attracting predators to less defended plants, where they are likely to find more abundant prey. It is tempting to speculate that plants under competition for light, to some extent trade direct for indirect defenses in order to attract natural enemies.*



*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original y producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifiquen explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*



## PUBLICACIONES

**Cortés LE**, Weldegergis BT, Boccalandro HE, Dicke M, Ballaré CL (2016). Trading direct for indirect defense? Phytochrome B inactivation in tomato attenuates direct anti-herbivore defenses whilst enhancing volatile-mediated attraction of predators. *New Phytologist* 212, 1057-1071.

C. V. González CV, Fanzone ML, **Cortés LE**, Bottini R, Lijavetzky DC, Ballaré CL, Boccalandro HE (2014). Fruit-localized photoreceptors increase phenolic compounds in berry skins of field-grown *Vitis vinifera* L. cv. Malbec. *Phytochemistry* 11, 46-57.

Auge GA, Rugnone ML\*, **Cortés LE\***, González CV, Zarlavsky G, Boccalandro HE, Sánchez RA (2012). Phytochrome A increases tolerance to high evaporative demand. *Physiologia Plantarum* 146, 228-235. (\*) Igual contribución de los autores.





## **DIVULGACIÓN**

**“Encuentran un nuevo mecanismo por el cual las plantas regulan sus defensa”**

Juan Manuel Repetto para la revista Sobre la Tierra, 21 de Noviembre de 2016

**“Descubren un truco del reino vegetal por el cual las plantas reclutan Guardaespaldas”**

Facundo Mesquida para la revista Info Campo, 21 de Noviembre de 2016.

**“Un truco vegetal para reclutar guardaespaldas”.**

Agencia CyTA-Instituto Leloir, 30 de Noviembre de 2016

**“Un estudio en el que participó el Instituto de Biología de Mendoza revela que las plantas son inteligentes”.**

Diario Los Andes Online, 1 de Diciembre de 2016.

**“Las plantas modifican su "perfume" para atraer insectos que actúan como "guardaespaldas””**

Diario La Voz Online, 1 de Diciembre de 2016.

**“Descubrieron que las plantas usan distintos mecanismos para regular sus defensas”.**

Programa La Posta de Radio Universidad (UNCuyo), 5 de Diciembre de 2016.

**“Las plantas usan un mecanismo inteligente para defenderse”**

Verónica De Vita para Diario Los Andes, edición impresa, 6 de Diciembre de 2016.

**“Los guardaespaldas de las plantas”**

TV Pública, Programa #EnLaRed, 7 de Diciembre de 2016.



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Señales externas que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas.....	<b>5</b>
<b>Figura 1.2.</b> Luz absorbida, reflejada y transmitida por los tejidos fotosintéticos.....	<b>7</b>
<b>Figura 1.3.</b> Distribución espectral de fotones de la radiación solar, de la radiación bajo un conopeo y de la radiación emitida por leds RL .....	<b>8</b>
<b>Figura 1.4.</b> Equilibrio del fitocromo .....	<b>10</b>
<b>Figura 1.5.</b> Interacciones tritróficas mediada por compuestos volátiles.....	<b>19</b>
<b>Figura 1.6.</b> Volátiles del <i>headspace</i> .....	<b>20</b>
<b>Figura 1.7.</b> Modelo general de la biosíntesis del ácido jasmónico (JA).....	<b>24</b>
<b>Figura 1.8.</b> Modelo actual de percepción de JA y activación de genes de respuesta.....	<b>25</b>
<b>Figura 1.9.</b> Esquema conceptual de las conexiones potenciales entre el phyB y la señalización de los JAs en la modulación de defensas en respuesta a la proximidad de plantas vecinas.....	<b>27</b>
<b>Figura 2.1.</b> Material vegetal e insectos utilizados.....	<b>34</b>
<b>Figura 2.2.</b> Esquema de cultivo.....	<b>37</b>
<b>Figura 2.3.</b> Dispositivo para la recolección de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).....	<b>45</b>
<b>Figura 2.4.</b> Esquema del olfatómetro en Y utilizado en los ensayos de <i>choice</i> .....	<b>47</b>

<b>Figura 3.1.</b> Efecto de la inactivación del phyB sobre parámetros morfológicos de la planta.....	<b>57</b>
<b>Figura 3.2.</b> Variedades de tricomas presentes en <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker y el efecto de la inactivación del fitocromo B (phyB) en la densidad de tricomas.....	<b>59</b>
<b>Figura 3.3.</b> Masa foliar por unidad de área (LMA).....	<b>61</b>
<b>Figura 3.4.</b> Efecto de la inactivación del phyB sobre la expresión de genes en respuesta a MeJA.....	<b>62</b>
<b>Figura 4.1.</b> Herbivoría y producción de HIPVs.....	<b>75</b>
<b>Figura 4.2.</b> Efecto del MeJA y la inactivación del phyB sobre el blend de compuestos volátiles colectados del espacio aéreo de plantas de tomate.....	<b>78</b>
<b>Figura 4.3.</b> Efecto de la inactivación del phyB sobre el blend de compuestos volátiles emitidos por plantas control e inducidas con MeJA.....	<b>79</b>
<b>Figura 5.1.</b> Efecto de la inactivación del phyB sobre la herbivoría en plantas de tomate.....	<b>92</b>
<b>Figura 5.2.</b> La inactivación del phyB en plantas inducidas con MeJA aumenta la atracción del predador <i>Macrolophus pygmaeus</i> .....	<b>94</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para PCR.....	<b>42</b>
<b>Tabla 3.1.</b> Contenido de compuestos fenólicos solubles en plantas WT y <i>phyB1phyB2</i> .....	<b>58</b>
<b>Tabla 3.2.</b> Valores de índice de tricomas (TI), densidad de tricomas (TD) y densidad de células epidérmicas (CD) en la cara abaxial y adaxial de plantas WT y <i>phyB1phyB2</i> .....	<b>60</b>
<b>Tabla 3.3.</b> Efecto de la inactivación del <i>phyB</i> sobre la producción de terpenos en hoja en respuesta a MeJA.....	<b>63</b>
<b>Tabla 4.1.</b> Compuestos volátiles detectados en el espacio aéreo de plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) <i>wild-type</i> y mutantes <i>phyB</i> .....	<b>76</b>
<b>Tabla 4.2.</b> Compuestos volátiles detectados en el espacio aéreo de plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) <i>wild-type</i> y mutante de <i>phyB</i> control.....	<b>81</b>
<b>Tabla 4.3.</b> Compuestos volátiles detectados en el espacio aéreo de plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) <i>wild-type</i> y mutantes de <i>phyB</i> inducidas con MeJA.....	<b>82</b>
<b>Tabla 4.4.</b> Compuestos volátiles detectados en el espacio aéreo de plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) <i>wild-type</i> inducidas con MeJA y crecidas bajo radiación natural y con suplementación de radiación RL.....	<b>83</b>





## ABREVIATURAS

WT	<i>Wild-type</i>
R	Rojo
RL	Rojo lejano
FR	<i>Far Red</i>
HR	Humedad relativa
phyB	Fitocromo B
<i>PHYB</i>	Alelo fitocromo B
phys	Fitocromos
SAS	Síndrome de escape al sombreado
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
JA	Acido Jasmónico
MeJA	Metil-jasmonato
GA	Giberelinas
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles
HIPVs	Volátiles de plantas inducidos por herbivoría
GLVs	Volátiles de hojas verdes
DMNT	( <i>E</i> )-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno
TMTT	( <i>E,E</i> )-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno
PIs	Inhibidores de proteasas
PPs	Fenilpropanoides
PPO	Polifenol oxidasa
LOX	Lipoxigenasa
TD	Treonina deaminasa
PIN-2	Inhibidor de proteasa 2
Campos	Patrones moleculares asociados a daños
Hampas	Patrones moleculares asociados a herbivoría
FACs	Ácidos grasos conjugados a aminoácidos
TF	Factor de transcripción
VIPS	Importancia de la variable en la proyección
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados
OPLS-DA	Análisis discriminante ortogonal de mínimos cuadrados parciales



## ÍNDICE

Comité asesor y jurados.....	I
Agradecimientos.....	II
Dedicatoria.....	IV
Resumen.....	V
<i>Abstract</i> .....	VI
Declaración.....	VII
Publicaciones.....	VIII
Divulgación.....	IX
Índice de figuras.....	X
Índice de tablas.....	XII
Abreviaturas.....	XIII
Índice.....	XIV

## Capítulo 1

Introducción general, objetivos e hipótesis.....	1
1.1 Introducción general.....	2
1.2 <i>Solanum lycopersicum</i> .....	5
1.3 La luz solar.....	6
1.4 Percepción del ambiente lumínico.....	8
1.5 El sistema de defensa de las plantas.....	11
1.5.1 Defensas directas.....	13
1.5.1.1 Defensas físicas.....	13
1.5.1.2 Defensas químicas.....	15
1.5.2 Defensas indirectas.....	18
1.6 Activación de las defensas por la vía del ácido jasmónico.....	21
1.7 El dilema de las plantas. ¿Crecer o defenderse?.....	25
1.8 Interacción de la radiación RL con las defensas indirectas.....	27
1.9 Objetivos e hipótesis de trabajo.....	28

## Capítulo 2

Materiales y Métodos.....	32
2.1. Materiales.....	33

2.1.1. Material vegetal.....	33
2.1.2. Insectos.....	33
2.1.2.1. <i>Mamestra brassicae</i> .....	33
2.1.2.2. <i>Macrolophus pygmaeus</i> .....	33
2.2. Métodos.....	34
2.2.1. Condiciones de cultivo.....	34
2.2.2. Tratamiento lumínico con radiación rojo lejana. Simulación de presencia de plantas vecinas.....	35
2.2.3. Simulación de herbivoría por tratamiento con MeJA exógeno.....	36
2.2.4. Cuantificación de tricomas.....	37
2.2.4.1. Cuantificación de tricomas de tallo por fotografía digital.....	37
2.2.4.2. Cuantificación de tricomas totales en hoja e índice de tricomas....	38
2.2.4.3. Cuantificación e identificación de los diferentes tipos de tricomas en hoja por microscopia electrónica de barrido (SEM).....	38
2.2.5. Cuantificación de la masa foliar por área (LMA).....	39
2.2.6. Determinación de compuestos fenólicos solubles por HPLC.....	39
2.2.7. Análisis de la expresión de genes vinculados a la defensa.....	40
2.2.7.1. Extracción de ARN.....	40
2.2.7.2. Cuantificación de ARN.....	41
2.2.7.3. Tratamiento con ADNasa del ARN.....	41
2.2.7.4. Síntesis de ADNc por transcripción reversa.....	41
2.2.7.5. Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real (RTq-PCR).....	42
2.2.8. Determinación de terpenos presentes en tejido foliar.....	43
2.2.9. Determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en el espacio aéreo de la planta ( <i>head-space</i> ).....	44
2.2.10. Ensayo de herbivoría con <i>Mamestra brassicae</i> .....	46
2.2.11. Ensayos de elección del predador <i>Macrolophus pygmaeus</i> en olfatómetro en Y.....	46
2.2.12. Análisis estadísticos.....	48

## Capítulo 3

El efecto del fitocromo B (phyB) sobre las defensas directas, estructurales y químicas, y su inducción ante el ataque de un herbívoro.....	50
3.1. Introducción.....	51
3.2. Resultados.....	55

3.2.1. Las bajas R:RL desencadenan el SAS y atenúan los niveles de defensas constitutivas.....	55
3.2.2. La inactivación del phyB modula el desarrollo de tricomas y afectan el espesor del tejido foliar.....	58
3.2.3. Las bajas relaciones R:RL reprimen la inducción de defensas mediadas por el JA.....	61
3.3. Discusión.....	63
3.3.1. La producción de compuestos fenólicos está modulada por el phyB....	64
3.3.2. La inactivación del phyB producto de bajas R:RL modula negativamente las defensas físicas en plantas intolerantes a la sombra.....	64
3.3.3. La proximidad de plantas vecinas reprime las respuestas de defensas mediadas por los jasmonatos a través de la inactivación de phyB.....	65
3.4. Conclusión.....	67

## Capítulo 4

### El efecto del fitocromo B (phyB) sobre la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) involucrados en las defensas indirectas, y su inducción por

MeJA.....	69
4.1. Introducción.....	70
4.2. Resultados.....	76
4.2.1. La inactivación del phyB, en plantas inducidas con MeJA, produce cambios en el blend de VOCs emitidos.....	76
4.2.2. La inactivación del phyB por métodos fisiológicos o genéticos genera un patrón de emisión de similar VOCs independiente del <i>approach</i> utilizado.....	82
4.3. Discusión.....	84
4.3.1. La inactivación del phyB en tomate altera la composición del blend de compuestos volátiles emitidos.....	84
4.3.2. La inactivación del phyB por métodos fisiológicos o genéticos genera patrones similares de emisión de VOCs .....	86
4.4. Conclusión.....	87

## **Capítulo 5**

### **Interacciones tritróficas. El efecto del fitocromo B (phyB) en la atracción de herbívoros y enemigos naturales.....89**

#### **5.1. Introducción.....90**

#### **5.2. Resultados.....91**

##### **5.2.1. Las plantas mutantes de phyB toleran mayor tasa de herbivoría que sus pares WT.....91**

##### **5.2.2. La inactivación del phyB en plantas inducidas con MeJA aumenta la atracción de enemigos naturales.....92**

#### **5.3. Discusión.....94**

##### **5.3.1. La inactivación del phyB en plantas de tomate incrementa su susceptibilidad a la herbivoría.....94**

##### **5.3.2. El efecto del phyB sobre las emisiones de VOCs tienen implicancias en las interacciones tritróficas.....95**

#### **5.4. Conclusión.....96**

## **Capítulo 6**

### **Conclusión general.....98**

#### **6.1. Conclusión general.....99**

## **Capítulo 7**

### **Bibliografía.....105**

#### **7.1. Bibliografía.....106**

# **Capítulo 1**

## **Introducción general, objetivos e hipótesis**

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 Introducción general

Durante el desarrollo de esta tesis tuve la oportunidad de poder contarles a colegas especializados, divulgadores y al público en general en qué consistía mi tema de estudio e investigación. En la mayoría de las conversaciones hacia el final, luego de un poco de asombro y todavía con algo de escepticismo surgía “la pregunta”: ¿Las plantas son inteligentes?

Los diccionarios convencionalmente definen a la inteligencia desde una óptica antropocéntrica, basándose en el comportamiento humano y desde el concepto que solo los humanos pueden ser inteligentes (Trewavas, 2005b).

¿Los seres humanos somos capaces de resolver problemas de manera satisfactoria en nuestra vida cotidiana? ¿Somos capaces de tomar decisiones y comportarnos de manera suficientemente correcta, lo que nos permita alcanzar nuestros objetivos? Pues, entonces somos inteligentes. Las plantas, al igual que nosotros, resuelven problemas y toman decisiones sobre su comportamiento durante su ciclo de vida y eso las convierte en seres inteligentes. Estos argumentos y definiciones corresponden a lo que el investigador Anthony Trewavas interpreta como inteligencia (Trewavas, 2014). En la bibliografía podemos encontrar trabajos como el de Firn (2004) y de Jong (2005), en las antípodas de Trewavas, donde descartan la posibilidad de considerar a las plantas como seres inteligentes.

Personalmente, la definición de inteligencia de Stenhouse (1974) me parece la más abierta y anfipática, dependiendo desde qué bando (pro- o anti-inteligencia vegetal) se la aborde. Stenhouse definió a la inteligencia en animales como el conjunto de comportamientos variables de carácter adaptativo que realizan en su ciclo de vida. Si tomamos esta definición y la extrapolamos al reino vegetal, podríamos tener dos visiones totalmente contrapuestas. Como la palabra comportamiento tiene una fuerte asociación a movimiento, y las plantas exhiben escasos, o movimientos fuera de nuestra escala temporal, diríamos que no son inteligentes. En contrapunto podríamos pensar que cuando más



inteligente es un organismo mayor es su capacidad de tomar conductas que le permitan adaptarse al medio. Dada la gran plasticidad que poseen las plantas y la capacidad de aclimatarse al ambiente circundante, no dudaríamos en decir que las plantas son inteligentes.

Existe una frase muy común sobre las plantas que dice que "...las plantas son organismos sésiles...". Esto quiere decir que no tienen la capacidad de moverse, están ancladas al sustrato y por tanto su ciclo de vida transcurre en ese mismo lugar. En una comparación mano a mano, esta característica ubica a las plantas en un sitio de desventaja frente a cualquier miembro del reino animal, que ante condiciones del entorno desfavorables, puede trasladarse a un nuevo sitio donde seguramente se sentirá más a gusto.

En cambio las plantas, al estar restringidas al ambiente donde se encuentran, se ven continuamente obligadas a tomar decisiones coyunturales. Algunas de sus elecciones podrían ser: cuándo y dónde buscar nutrientes y cómo distribuirlos en todo el organismo; cuando iniciar el ciclo reproductivo y qué cantidad de descendencia dejar; cómo defenderse de ataques externos y en qué órganos y tejidos poner más énfasis; y cuándo y dónde liberar señales químicas hacia otros organismos del ecosistema. A su vez, estas decisiones deben ser tomadas en un contexto dinámico donde las variables del ambiente tales como la luz, el agua, los nutrientes, el viento, la temperatura y la presencia de competencia y predadores cambian constantemente (**Figura 1.1**). Para poder tomar las mejores decisiones, las plantas han adquirido durante su evolución la capacidad de integrar el conjunto de señales percibidas del medio ambiente, y en consecuencia desencadenar un repertorio de respuestas cuyo balance es crucial para determinar el éxito de los individuos en el ambiente donde se desarrollan.

Ante el panorama al que se enfrentan las plantas, deberíamos considerar la existencia de un sistema de procesamiento inteligente, que le permita integrar y coordinar una respuesta. Ante las diferentes posiciones en torno a la inteligencia vegetal, podríamos preguntarnos si el comportamiento de las plantas responde a patrones pre-programados, autonómicos o verdaderamente es resultado de un mecanismo inteligente (Trewavas, 2005a). Si tomamos como ejemplo la dirección de elongación del tallo de una plántula que intencionalmente colocamos de manera horizontal, veríamos que automáticamente se alinearía

con el vector gravedad. Ahora bien este efecto gravitrópico puede ser alterado por un gradiente de temperatura, minerales o agua, colocado con diferentes polaridades sobre el vector gravedad. Como consecuencia, la respuesta de inclinación del tallo será la resultante de la integración de todos los factores ambientales variables y constantes. Una respuesta autonómica es independiente del ambiente y se presenta como resultado del flujo de información transportado por una única vía. Un ejemplo de comportamiento autonómico en humanos es el reflejo rotuliano. Las plantas son sensibles a al menos diez factores abióticos y seis bióticos. A su vez si tenemos en cuenta que las plantas pueden detectar diferentes intensidades de ese factor, digamos cinco intensidades diferentes (subestimación) y que los factores pueden variar independientemente unos de otros, el número de posibles escenarios en el cual la planta se desarrollara será de alrededor de 100 millones ( $1 \times 10^8$ ). Queda bastante claro que una hipotética pre-programación genética sería muy poco probable y lo que se sugiere es que una respuesta de carácter inteligente y flexible pueda conferir al individuo la habilidad de escribir su propio destino dentro de un ambiente en continuo cambio (Trewavas, 2005a).

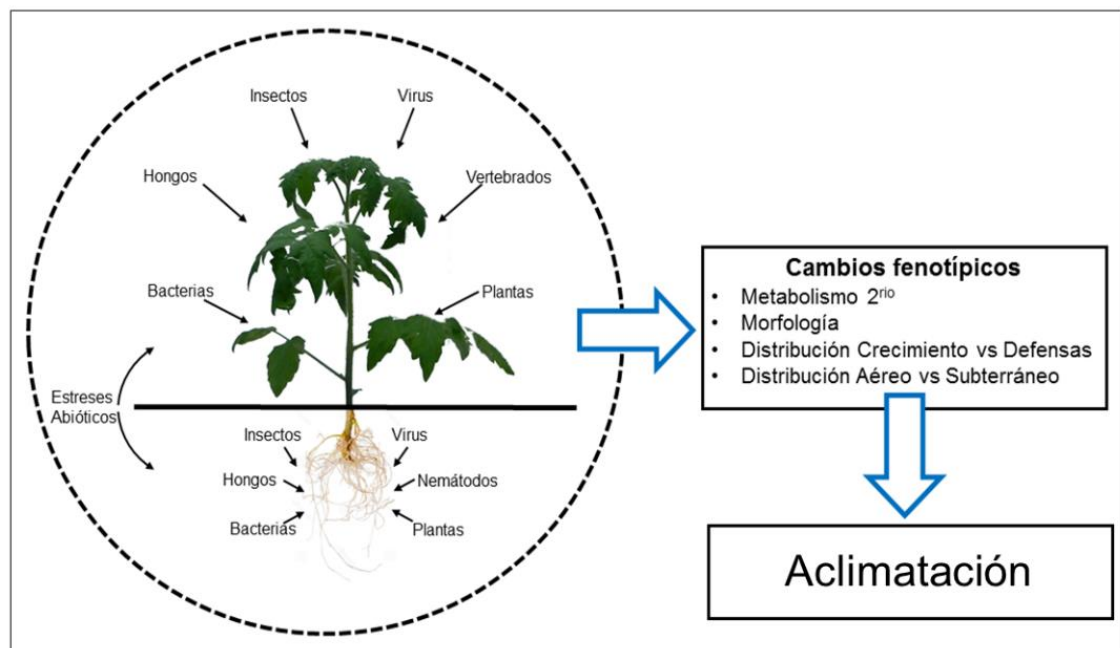
Las células vegetales poseen una amplia gama de receptores que le permiten monitorear las condiciones variables del ambiente. La recepción y transducción de una señal hacia el interior de la célula genera la activación de diversas vías de señalización que pueden ramificarse, converger, divergir o integrarse con aquellas que provienen de otras células. La integración de estas vías y el procesamiento de la información pasan a otros tejidos de la planta donde interaccionan con la información allí recibida y por lo tanto es nuevamente modificada y procesada. De esta manera se genera una red de información integrada de toda la planta, que le permite evaluar los costos y beneficios de un potencial cambio comportamental, y asegurar que la inversión puesta en juego no sobrepase a las ganancias que una posible aclimatación al nuevo ambiente pueda generar (Trewavas, 2005b)

Dentro de la amplia gama de obstáculos que deben sortear las plantas a lo largo de su desarrollo, existen dos en los cuales haremos foco en la presente tesis; la competencia intra-específica y la amenaza de insectos fitófagos.

En la presente tesis se utilizó el modelo de *Solanum lycopersicum* con el fin de estudiar cómo las alteraciones del ambiente lumínico producto de la presencia

de plantas vecinas, sensado por fotorreceptores específicos, afectan los sistemas de defensas, directos e indirectos, de una planta en estudio, como también las implicancias ecológicas sobre el desarrollo y la aptitud de insectos fitófagos y sus enemigos naturales.

Los invito a que durante esta tesis podamos responder aquellas preguntas específicas de este trabajo de investigación, y que con el correr de las páginas podamos responderlas y finalmente convencernos de cuán astutas e inteligentes las plantas pueden ser.



**Figura 1.1.** Señales externas que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas. La integración de estas genera cambios fenotípicos en la planta que le permiten aclimatare al medio circundante.

## 1.2 *Solanum lycopersicum*

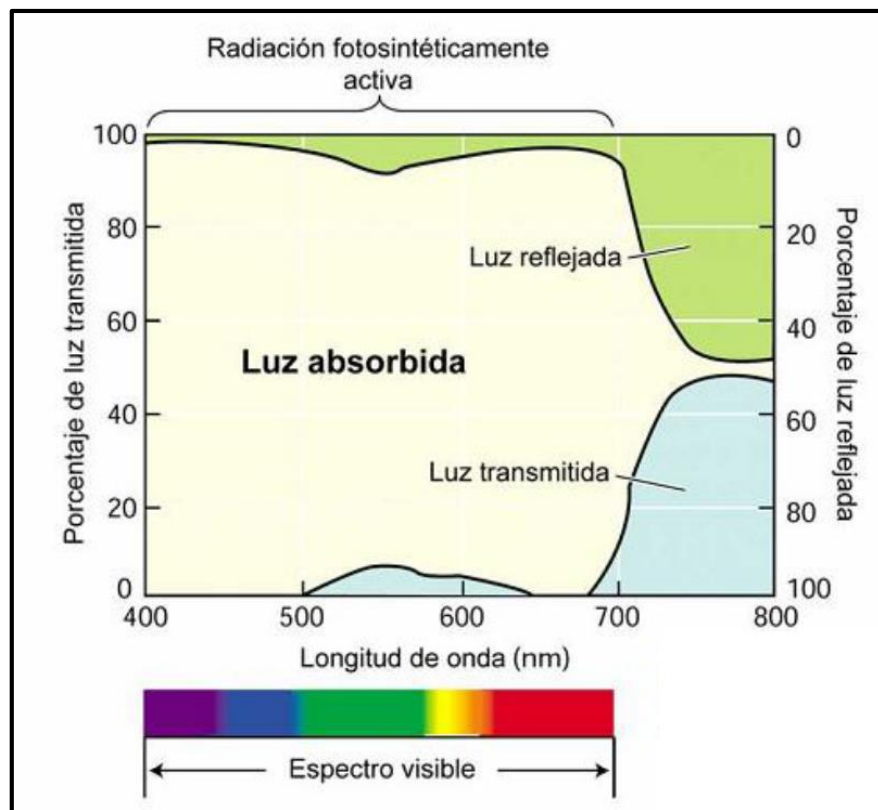
*Solanum lycopersicum*, *pomme d'amour*, *pomme d'Or*, o bien *tomatl* son diferentes maneras para nombrar al tomate. Su origen es propio de centro América y los Andes peruanos, y fueron los españoles, en el siglo XVI, los encargados de introducirlo primero en Europa y luego en Asia. Su presencia a nivel mundial lo hace una de las hortalizas con mayor superficie de cultivo y por ende importante valor agronómico y comercial. El tomate es una angiosperma,

dicotiledónea, de la familia de las *Solanaceae*. Si bien el organismo modelo por excelencia en biología vegetal es *Arabidopsis thaliana*, con el correr del tiempo el tomate se ha convertido en un atractivo modelo para el estudio de especies con frutos de pulpa. Además de su importancia nutricional y agronómica el tomate posee: (a) un genoma relativamente pequeño (950 Mb) y totalmente secuenciado, (b) su cultivo en cámara e invernáculo es sencillo y se obtienen plantas para ensayos en dos a tres semanas, (c) es fácil de transformar genéticamente lo que permite la generación de nuevas líneas mutantes para análisis funcionales, (d) existe un gran número de líneas mutantes, ancestros silvestres y recursos genómicos y moleculares disponibles, (e) es un cultivo de gran importancia económica. Además de las características anteriormente mencionadas este modelo ha sido históricamente muy utilizado en el estudio de las interacciones planta-insecto; donde el aporte del Dr. Clarence Ryan en la década de los 70 y 80 dio las primeras evidencias de defensas inducidas (Green y Ryan, 1972). A su vez este modelo ha sido muy utilizado en ensayos de interacciones tritróficas (Pearce *et al.*, 1991; Thaler *et al.*, 1999; Scranton *et al.*, 2013; Cortes *et al.*, 2016) y su repertorio de defensas directas e indirectas ha sido bien caracterizado (Cortes *et al.*, 2016). Estas características han prevalecido a la hora de elegir el modelo biológico de estudio de la presente tesis.

### **1.3 La luz solar**

La energía emitida por el sol se propaga en el vacío por el espacio y viaja en todas las direcciones y hacia la tierra en forma de ondas electromagnéticas de longitud de onda variables. El conjunto de todas las longitudes de onda comprende el espectro electromagnético. Parte del espectro es filtrado en la atmósfera, y otra porción comprendida entre los 200 y 800 nm llega a la superficie de la tierra, hecho fundamental para el desarrollo de la vida. Frente a todos los estímulos ambientales a los que se encuentran sometidas las plantas, la luz es probablemente uno de los más importantes. La luz solar posee una doble función en las plantas, puede actuar como fuente primaria de energía, o bien como fuente de señales del ambiente circundante. La porción del espectro

comprendida entre los 400 a 700 nm, conocida como espectro de luz visible, es utilizada por las plantas como fuente de energía para la fijación del  $\text{CO}_2$  y la consecuente producción de hidratos de carbono durante el proceso de fotosíntesis. Esta porción del espectro es también denominada radiación fotosintéticamente activa (PAR, *Photosynthetically Active Radiation*) y constituye aproximadamente el 50% del total de la radiación incidente. Las longitudes de onda flanqueantes del espectro visible correspondientes a los 200 a 400 nm y 700 a 800 nm son la región del ultravioleta y rojo lejano respectivamente, estas franjas de radiación son una importante fuente de información sobre entorno de la planta (**Figura 1.2**).

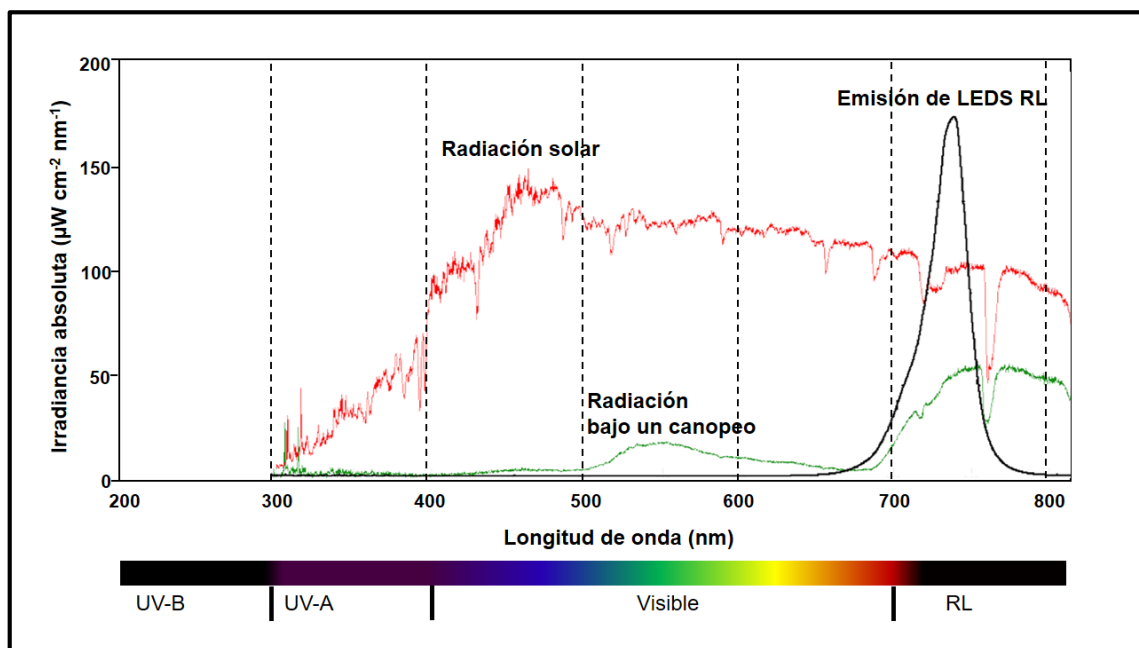


**Figura1.2.** Luz absorbida, reflejada y transmitida por los tejidos fotosintéticos. En amarillo se puede observar la luz absorbida por las hojas, en verde la luz reflejada y en celeste la luz transmitida. La mayor parte de las radiaciones del espectro visible son absorbidas mientras que la radiación RL (700-800nm) es reflejada y transmitida. (Taiz y Zeiger, 2002).

Los organismos fotosintéticos son capaces de transformar la energía lumínica en energía química estable, la cual puede llegar a durar hasta cientos

de millones de años como por ejemplo en los combustibles fósiles. Durante el proceso de fotosíntesis la energía es absorbida por las clorofilas y los carotenoides para luego de numerosos pasos transformarla en energía química. Estos pigmentos absorben fuertemente en las regiones del azul y del rojo (R); el resto de la radiación se refleja y/o transmite a través de la hoja. Entre las longitudes de onda reflejadas o transmitidas se encuentran las correspondientes al RL, esto hace que se establezca una baja relación R:RL (Figura 1.3) en comparación con la de la luz solar, cuya relación es de aproximadamente 1,2 (Smith, 1995). **(Figura 1.3)**

La calidad, cantidad, dirección y las variaciones espacio-temporales convierten a la luz en un estímulo sumamente complejo y heterogéneo. Es por ello, que las plantas han tenido que desarrollar un sistema de percepción de su entorno que les permite detectar las diferentes porciones del espectro solar y así poder caracterizar su espacio circundante.



**Figura 1.3.** Distribución espectral de fotones de la radiación solar, de la radiación bajo un canopeo y de la radiación emitida por fuentes de LED Rojo lejano (Greenpower LEDs, Philips). Se puede observar que bajo canopeo aumenta la proporción de las longitudes de onda RL.

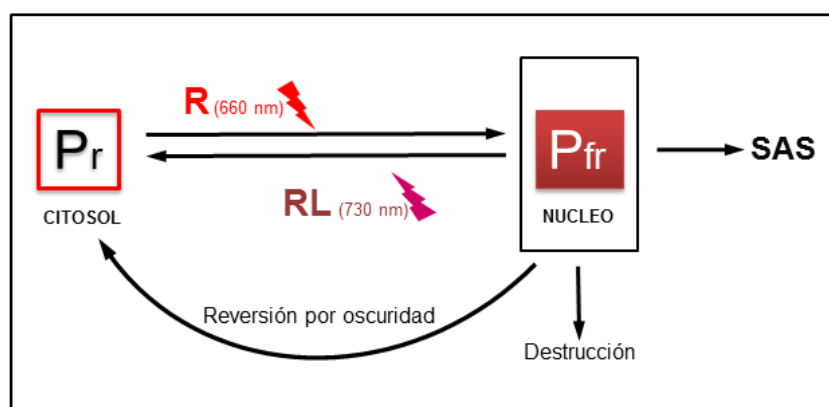
## 1.4 Percepción del ambiente lumínico

Si consideramos a la visión en un sentido más amplio que el de formar una imagen en la retina, como un mecanismo para percibir señales ambientales lumínicas que nos permita conocer el entorno que nos rodea, podríamos decir que las plantas ven.

Evolutivamente las plantas han desarrollado sorprendentes mecanismos de detección y respuesta a diversos factores bióticos y abióticos. Como se mencionó anteriormente, la luz posee una función bivalente en las plantas, como fuente de energía y también proveer información del ambiente. Cuando hablo de información del ambiente o bien señales lumínicas ambientales, me refiero a las distintas características de la radiación a las que están sometidas las plantas como son: la intensidad, calidad, y la variación diurna y estacional (duración y dirección). Esta percepción de cambios lumínicos se lleva a cabo por un conjunto de fotorreceptores que operan en diferentes longitudes de onda. Entre ellos se encuentran los fitocromos (phys) que tienen máxima sensibilidad en las regiones del R (660 nm) y el RL (730 nm) (Franklin, 2008), las fototropinas y criptocromos que tienen un papel preponderante en la percepción de la luz azul (400-500 nm) y la radiación ultravioleta A (UV-A, 315-400 nm) (Briggs y Christie, 2002). La percepción de la radiación ultravioleta-B (UV-B, 280-315 nm) es llevada a cabo por la proteína UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8) (Rizzini *et al.*, 2011). Gracias a la acción coordinada de las distintas familias de fotorreceptores es que las plantas han desarrollado respuestas adaptativas a la luz entre las que se destacan el fototropismo, el escape al sombreado, la sincronización de los ritmos circadianos y la floración.

En tomate, los fitocromos se encuentran codificados por una pequeña familia multigénica compuesta por cinco genes (*PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* y *PHYF*) (Pratt *et al.*, 1997; Alba *et al.*, 2000). Estos fotorreceptores están formados por dos componentes: una proteína (PHY), sintetizada en el citosol, y un cromóforo de estructura tetrapirrol de cadena abierta (fitocromobilina) sintetizado en cloroplastos. Su biosíntesis involucra la convergencia de dos vías que culminan en el ensamble de la holoproteína (phy) activable por la luz. Todos los phys se encuentran como dímeros, compuestos por dos polipéptidos de 125-kDa, que se presentan en dos conformaciones interconvertibles. La

conformación Pr absorbe principalmente luz R y la conformación Pfr absorbe luz RL. Durante la fotoconversión del cromóforo se produce un cambio en la estructura de la proteína (Rockwell y Lagarias, 2006) y en la localización intracelular, cuando la cromoproteína absorbe luz R es fotoconvertida de la forma Pr (inactiva) a la forma Pfr (activa). La forma Pfr se puede convertir a la forma Pr por la absorción de RL o de una manera independiente de la luz (reversión en oscuridad) (**Figura 1.3**). Los espectros de absorción de la forma Pfr y Pr se solapan parcialmente, estableciéndose así un equilibrio. La cantidad de Pfr en relación a la cantidad total de fitocromo ( $Pfr:P_{total}$ ) dependerá de la composición espectral de la luz. En condiciones de altas relaciones R:RL el phy reside en el núcleo predominantemente en su forma activa (Pfr), cuando esta relación R:RL es baja el phy es parcialmente inactivado y en su forma inactiva Pr migra al citoplasma (Smith, 1995). El principal fotorreceptor utilizado por las plantas para detectar la proximidad de sus vecinas es el fitocromo B (phyB) (Ballare, 2009; Keuskamp *et al.*, 2010; Ballare y Pierik, 2017). En tomate son dos, phyB1 y phyB2 y trabajan de manera concertada (Weller *et al.*, 2000). Como ya se mencionó, la relación R:RL de la radiación solar directa es de 1,2, mientras que ésta disminuye dentro del canopeo a medida que aumenta la densidad de plantas; es así que bajo radiación solar directa puede establecerse un fotoequilibrio de 60 %  $Pfr:P_{total}$  mientras que bajo un canopeo denso el fotoequilibrio puede llegar a niveles del 0,1 %  $Pfr:P_{total}$  (Smith, 2000).



**Figura 1.4.** Equilibrio del fitocromo. En presencia de luz roja (660nm) el fitocromo se encuentra en su forma activa Pfr en el núcleo. Cuando perciben luz roja lejana (730nm), se inactiva (Pr) y sale del núcleo. En ausencia de luz, Pfr se inactiva.



Dado que las clorofilas absorben eficientemente la radiación en la región del R pero no en el RL del espectro solar, la resultante baja relación R:RL es un buen indicador de sombreado directo (en conjunto con una baja irradiancia) (Holmes y Smith, 1977) o bien proximidad de plantas vecinas (reflexión de RL) (Ballare *et al.*, 1990). La inactivación del phyB desencadena la activación de distintas vías de señalización relacionadas con el crecimiento, y que están reguladas por hormonas como auxinas (Tao *et al.*, 2008) y giberelinas (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008). El conjunto de cambios morfo-fisiológicos generados a partir de la inactivación del phyB se denomina Síndrome de escape al Sombreado (SAS, *Shade Avoidance Syndrom*). Este fenómeno se manifiesta por alargamiento de tallos y peciolo de hojas hacia claros de luz, reposicionamiento erecto de las hojas, menor ramificación y área foliar (Casal, 2012b), floración anticipada, mayor profundización de la raíz, menor diámetro de vasos xilemáticos y menor diferenciación de estomas (Boccalandro *et al.*, 2009; Ballare y Pierik, 2017). En conjunto todos estos cambios, desencadenados por una señal lumínica rica en radiación RL, le confieren a la planta una plasticidad fenotípica que tiene como fin preparar a la planta de manera anticipada a futuros escenarios de competencia con otras plantas.

### **1.5 El sistema de defensa de las plantas**

Los seres vivos que habitamos este planeta estamos en menor o mayor medida expuestos a amenazas que atentan contra nuestra integridad física; las plantas no son una excepción. En su ambiente natural, las plantas enfrentan riesgos de ser atacadas por una gran variedad de organismos, incluyendo virus, bacterias, hongos, nemátodos, vertebrados, así como por insectos e incluso por otras plantas.

La puja entre plantas y herbívoros data de más de 350 millones de años. Esto quiere decir que durante este tiempo estos dos grupos de organismos han co-evolucionado, y continuamente han generado estrategias para evitar el sistema de defensa del otro. Desde el punto de vista vegetal, esta “carrera armamentística” ha resultado en el desarrollo de un completo y sofisticado sistema

de defensa (Howe y Jander, 2008; Hare, 2011). Análogamente al sistema inmune animal, las plantas poseen un sistema de reconocimiento de señales del daño a sus propias células como asimismo de moléculas no propias. Este reconocimiento genera una activación de una respuesta inmune eficaz contra el organismo invasor (Jones y Dangl, 2006; Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse, 2012; Spoel y Dong, 2012; Ballare, 2014) que les permite a las plantas hacer frente a los numerosos organismos herbívoros y patógenos presentes en los ecosistemas.

Para contrarrestar el ataque de un herbívoro, las plantas poseen un complejo arsenal de defensa que en última instancia tendrá un efecto tóxico, repelente o antinutricional sobre el atacante. Este arsenal podemos clasificarlo en dos grandes grupos: defensas estructurales o físicas y defensas químicas (metabolismo secundario y proteínas) (War *et al.*, 2011). A su vez, las plantas pueden enfrentar al herbívoro de dos maneras, haciendo que este no la prefiera y su supervivencia y reproducción no sea exitosa (directa), o bien reclutando otras especies que sean enemigos naturales del herbívoro (indirecta) (Karban y Baldwin, 1997). Las defensas directas están mediadas por características de la planta que afectan la biología del insecto, como puede ser la protección física de la superficie (tricomas, espinas y el grosor de la hoja) o bien por la producción de compuestos tóxicos (terpenoides, alcaloides, fenólicos, etc.) que pueden retrasar el desarrollo del insecto o causarles la muerte. Por su parte las defensas indirectas frecuentemente involucran la liberación de *blends* (mezcla) de VOCs (compuestos orgánicos volátiles) y/o la provisión de “casa y comida” (p. ej., néctar extra floral) para atraer a enemigos naturales de los herbívoros (Schoonhoven *et al.*, 2005; Dicke, 2009; Izaguirre *et al.*, 2013; Cortes *et al.*, 2016). Ambos mecanismos de defensa (directos e indirectos) se pueden presentar de manera constitutiva o ser inducidos por el daño ocasionado por el herbívoro (Karban, 2008; Metlen *et al.*, 2009). La producción constitutiva de defensas implica un costo metabólico constante y obligado, capitalizable ante el inminente ataque de una plaga. Las respuestas inducidas también presentan un costo metabólico, ya que todos los compuestos químicos se sintetizan *de novo* en respuesta al ataque, pero esa inversión solo se realiza cuando es necesaria (Agrawal, 2000). Esta capacidad de activarse ante el ataque, le confiere a la planta plasticidad fenotípica. La manera de alimentarse del herbívoro, y como

consecuencia el tipo de daño causado en la planta, genera patrones de inducción diferentes. Estas variaciones se pueden deber a la producción de distintos elicitors o bien a los distintos tipos de daño mecánico causado (Heidel y Baldwin, 2004; Agrawal, 2011). La versatilidad del arsenal de defensa (directo, indirecto, constitutivo y/o inducible) le confiere a la planta una gran ventaja a la hora de hacer frente al ataque de una plaga y poder continuar con su ciclo de vida.

### **1.5.1 Defensas directas**

El conjunto de todas las estructuras morfológicas y anatómicas (defensas físicas) como ceras, espinas, tricomas, esclerofilia y la lignificación, forman la barrera primaria contra el ataque del herbívoro. El conjunto de metabolitos secundarios y proteínas, que actúan como toxinas y afectan el crecimiento y desarrollo del herbívoro una vez que la plaga está instalada forman las sucesivas barreras de defensa (Hanley *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2009). La activación concertada de los componentes directos genera una sinergia donde se potencian las defensas contra el invasor. En tomate un *cocktail* de alcaloides, compuestos fenólicos, inhibidores de proteasas y enzimas oxidativas poseen un efecto concertado en la ingestión, digestión y metabolismo del herbívoro, en cambio si son ingeridos individualmente el efecto será limitado a un paso del proceso digestivo (Duffey y Stout, 1996).

#### **1.5.1.1 Defensas físicas**

Las defensas físicas o estructurales son la primera línea de defensa y juegan un rol fundamental en la resistencia de la planta huésped (HPR) frente al ataque de una plaga. Este tipo de defensas son un conjunto de estrategias morfológicas y anatómicas que le confieren a la planta la capacidad de disuadir al herbívoro y evitar de forma directa ser atacada (Hanley *et al.*, 2007). Dentro de este tipo de defensas podemos encontrar distintos tipos de espinas (espinescencia), tricomas (pubescencia) y la dureza de las hojas (esclerofilia).

La esclerofilia se refiere a la dureza que tienen las hojas y juega un rol preponderante en la defensa de la planta al reducir la palatabilidad y digestibilidad de los tejidos, produciendo de esta forma una disminución del daño causado por el herbívoro. Si bien una hoja escleromórfica no evita el ataque, si hace que el insecto explore otras opciones más palatables presentes en el ambiente. La masa foliar específica o *leaf mass per área* (LMA), razón entre el peso seco y el área de la hoja, ha sido considerado como una medida de la asignación de recursos de la planta a defensas físicas contra la herbivoría (Choong *et al.*, 1992). La disminución en el LMA implica mayor dureza debido a hojas más gruesas y/o más densas. La espinescencia es un término general para describir el conjunto de estructuras como tricomas espinas o aguijones. A pesar de atribuírsele otras funciones, como la reflexión de radiación excesiva, las espinas han evolucionado como un mecanismo de defensa anti-herbívoro. Existe numerosa evidencia de que el principal destinatario de este tipo de defensas son los herbívoros vertebrados, debido a la paridad en la relación planta-huésped (Myers, 1991). La pubescencia se refiere a la capa de pelos o tricomas presentes en tallos, hojas e inclusive frutos. Los tricomas son estructuras uni- o multicelulares originados a partir de la diferenciación de células epidérmicas de la parte aérea de la planta. Estas estructuras, presentes en varias especies del reino vegetal, varían considerablemente en tamaño, forma y densidad, y pueden ser utilizados para la identificación de nuevas especies. La función que cumplen los tricomas son diversas y están estrechamente relacionadas con su morfología (Levin, 1973). Evolutivamente se cree que estas estructuras han surgido como barreras fisiológicas con la función de proteger a la planta de estreses abióticos como la excesiva radiación solar (Manetas, 2003), la pérdida de agua y las altas temperaturas (Levin, 1973), o bien como mecanismo de dispersión de semillas o frutos. Sin embargo existe evidencia centenaria (Haberlandt, 1914) y más reciente (Hanley *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2012) sugiriendo que los tricomas tienen un rol importante en defensas frente a herbívoros. La variabilidad en su morfología le permite a los tricomas cumplir variadas funciones en defensa (Kennedy, 2003). Para herbívoros masticadores es un impedimento a la hora de alimentarse de tejidos altamente pubescentes. La ovoposición se ve afectada negativamente por la poca adherencia que presenta la hoja donde se va a depositar el huevo y a su vez ciertos tipos de tricomas en forma de ganchos

generan dificultades en la locomoción del insecto a tal punto de dejarlo atrapado (Van Haren *et al.*, 1987). Por su parte los tricomas glandulares, de los cuales en *Solanum lycopersicum* cv. *Moneymaker* existen cuatro tipos, I, IV, VI y VII, son un excelente ejemplo de la acción combinada de las defensas estructurales y químicas, ya que secreta metabolitos secundarios a la vez que pueden dificultar la locomoción y adherencia del insecto.

#### **1.5.1.2 Defensas químicas**

Las plantas producen una gran y diversa cantidad de compuestos orgánicos que a primera vista podríamos decir que no poseen una función directa en el crecimiento y desarrollo, pero que por alguna razón han prevalecido durante su evolución. Estos compuestos son derivados de rutas biosintéticas diversas y se los conoce como *metabolitos secundarios* o *productos naturales*. La materia prima para la síntesis de estos compuestos proviene del metabolismo primario. A diferencia de los compuestos del metabolismo primario, los metabolitos secundarios no están distribuidos de manera universal en el reino vegetal. Algunos metabolitos se encuentran presentes solamente en una cierta especie, género o familia, lo cual los hace específicos de un determinado grupo de plantas y de gran ayuda en taxonomía. Si bien en un principio estos compuestos no fueron asociados con procesos vitales de la planta (fotosíntesis, biosíntesis de macromoléculas, transporte de solutos, etc.) (Fraenkel, 1959), son el componente principal del arsenal de defensas químicas que las plantas poseen contra herbívoros y patógenos. De acuerdo a su estructura química, los metabolitos secundarios pueden agruparse en tres grandes familias: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados.

Los terpenos constituyen la familia más numerosa de metabolitos secundarios (>60.000) (Pazouki y Niinemets, 2016). Se originan por condensación enzimática de dos o más unidades de isopreno (C<sub>5</sub>) y están distribuidos universalmente en el reino vegetal. De acuerdo al número de unidades de isopreno que los componen, los terpenos se pueden clasificar en: monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), tetraterpenos (C<sub>40</sub>) y politerpenos (C<sub>>40</sub>). No obstante, dentro de cada grupo,

cada compuesto es susceptible a la acción de enzimas oxidativas y transferasas, lo cual genera una gran combinatoria de diferentes productos, un ejemplo de ello son los homoterpenos DMNT (C<sub>11</sub>) y TMTT (C<sub>16</sub>), producto de la oxidación de sesqui- y diterpenos respectivamente (Richter *et al.*, 2016). Asignarle un rol específico a cada terpeno en particular puede ser difícil, puesto que las plantas emiten un *blend* de ellos. Sin embargo, si los componentes del *blend* están identificados, pueden ser ofrecidos individualmente al herbívoro o al enemigo natural y estudiar el posible efecto sobre los mismos. Dentro de la gran familia de terpenos, los mono-, sesqui- y homoterpenos son los más destacados en su rol de defensas y son los componentes mayoritarios de los compuestos volátiles emitidos por las plantas. Los monoterpenos, linalool y  $\alpha$ -pineno, y el sesquiterpeno (*E*)- $\beta$ -farneseno, actúan de manera directa como repelentes de herbívoros y áfidos respectivamente (Maffei, 2010). Por su parte, el homoterpeno TMTT y el sesquiterpeno (*Z*)-(*E*)-nerolidol actúan de manera indirecta atrayendo ácaros depredadores (De Boer *et al.*, 2005; Mithofer *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos son una gran familia (> 10.000 compuestos) caracterizada por la presencia de un grupo fenol en su estructura química. Estos compuestos frecuentemente cumplen funciones de defensa, pero también tienen roles importantes como agentes fotoprotectores, atractores de polinizadores y sostén mecánico, entre otros. Sobre la base de su estructura los compuestos fenólicos pueden clasificarse en fenólicos simples o complejos. Dentro de los simples se encuentran los fenilpropanoides (PPs, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), lactonas de PPs y derivados de ácido benzoico. Los fenólicos complejos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) están constituidos por las flavonas, flavonoles, isoflavonoles, antocianinas, ligninas y taninos. Al ser una familia altamente heterogénea, así también lo es su modo de acción en defensas. La oxidación de ácido clorogénico, un fenilpropanoide, por polifenoloxidasas de la planta o presente en la saliva del herbívoro genera una quinona capaz de conjugarse con aminoácidos libres y proteínas, produciendo una disminución de la biodisponibilidad de estos y una menor digestibilidad (Leiss *et al.*, 2009). Por parte de los taninos, investigaciones recientes han encontrado que su función anti-herbívoro no está relacionada con la digestión de proteínas, sino con la génesis de quinonas y otras especies reactivas del oxígeno producto de la oxidación en el tracto digestivo del herbívoro (Barbehenn y Constabel, 2011).

Dentro de los compuestos nitrogenados podemos nombrar a los compuestos cianogénicos, los glucosinolatos, los alcaloides y las proteínas de defensa. Los compuestos cianogénicos y los glucosinolatos son dos clases de compuestos que comparten la particularidad de presentarse en un estado conjugado pre-activo. Dada la toxicidad que representan para las plantas, estos compuestos se almacenan en vacuolas separadas de su respectiva enzima activadora. Cuando se genera un daño en la planta producto de la acción de un herbívoro, el contenido celular se mezcla y se produce la interacción de los compuestos con sus respectivas enzimas. La acción de una glicosidasa sobre los compuestos cianogénicos y de la mirosinasa sobre los glucosinolatos produce la liberación de cianuro de hidrógeno (HCN) y isotiocianato (SCN) respectivamente. El modo de acción de estos compuestos es bien conocida (Jones y Vogt, 2001; Textor y Gershenzon, 2009). La toxicidad del HCN, se debe a que el ion  $\text{CN}^-$  inhibe la respiración celular, mientras que el SCN tiene la propiedad de unirse e inactivar proteínas y ácidos nucleicos. Los alcaloides son una familia de compuestos (>15.000) donde el átomo de nitrógeno usualmente se encuentra formando un anillo heterocíclico. Dependiendo de la forma de ese anillo, es que se clasifican las distintas sub-familias. Estos compuestos se sintetizan a partir de aminoácidos, y si bien no poseen una función primaria, tienen un papel importante en las defensas de las plantas. Los alcaloides actúan en varios niveles del metabolismo animal; pueden bloquear sitios activos de enzimas alterando procesos fisiológicos; intercalarse con el ADN inhibiendo procesos de síntesis y reparación; actuar como análogos de hormonas y/o neurotransmisores alterando el sistema nervioso y endócrino. El daño producido por un herbívoro desencadena, entre otras cosas, la expresión de una batería de proteínas de defensa que ejercen un efecto directo sobre el atacante. Este arsenal proteico que la planta posee incluye, inhibidores de proteasas (PIs) del tracto digestivo del insecto, y otras proteínas que intervienen negativamente con la fisiología y anatomía digestiva. La inhibición de proteasas por parte de los PIs, genera una deficiencia de aminoácidos que en consecuencia afecta el crecimiento y desarrollo del herbívoro (Lison *et al.*, 2006). Otras proteínas como las cistein-proteasas y las quitinasas interaccionan con el epitelio del tracto digestivo produciendo un daño irreversible (Lawrence y Novak, 2006). Las enzimas oxidativas, polifenol oxidasa (PPO) y lipooxigenasa (LOX) modifican de

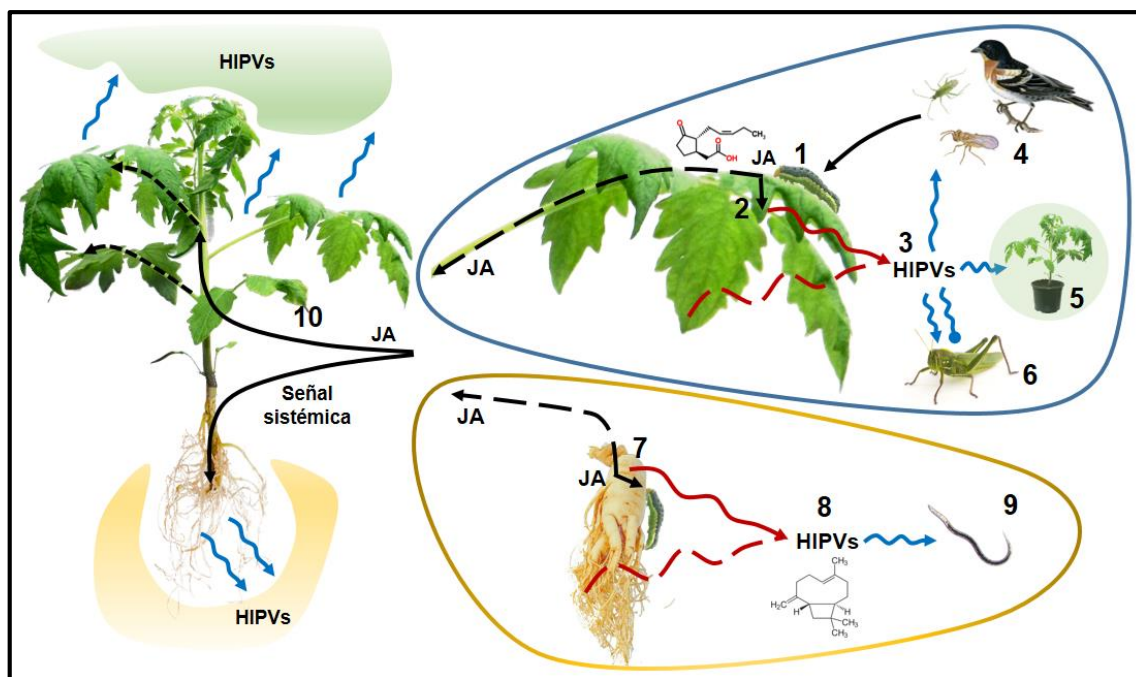
manera covalente las proteínas ingeridas por el insecto, disminuyendo su digestibilidad (Constabel *et al.*, 1995). Por su parte la arginina y treonina deaminasa (TD) degradan los aminoácidos esenciales arginina y treonina respectivamente. Este arsenal proteico actúa degradando la anatomía digestiva del insecto y disminuyendo la disponibilidad de aminoácidos en el tracto digestivo. Un bajo contenido proteico en la dieta del insecto es un factor limitante en el crecimiento y desarrollo del mismo, lo que lo obligará a explorar otras opciones más nutritivas y palatables (Mattson Jr, 1980).

### 1.5.2 Defensas indirectas

Las plantas están presentes en el menú de un sinnúmero de individuos que van desde microorganismos hasta mamíferos. Muchas de las estrategias de defensa que las plantas usan para hacer frente a esta situación dependen de mutualismos. De la misma manera que muchas plantas interactúan con polinizadores, dispersadores de semillas y microorganismos que facilitan la adquisición de minerales, también lo hacen con animales del tercer nivel trófico que les brindan protección frente a los del segundo nivel. Este último tipo de interacción es lo que se conoce como defensa indirecta y consiste en reclutar a individuos “guardaespaldas”, carnívoros y parasitoides (Bruinsma y Dicke, 2008), nematodos entomopatógenicos (Rasmann y Agrawal, 2008) y aves insectívoras (Mantyla *et al.*, 2008) a cambio de refugio y alimento, o bien mediante la emisión de compuestos volátiles inducidos por herbivoría (HIPVs) (Dicke y Sabelis, 1988a). Este mecanismo es conocido como “*Cry for help*” y se ha observado en más de 20 familias de plantas (Dicke *et al.*, 1990b; Hilker y Fatouros, 2015). Las primeras evidencias sobre la emisión de HIPVs fueron en ensayos con ácaros y orugas defoliadoras (Dicke y Sabelis, 1988a; Turlings *et al.*, 1990). Sin embargo, hoy en día se ha demostrado que las plantas tienen la capacidad de emitir compuestos volátiles en respuesta al ataque de minadores de hoja, barrenadores de tallo, insectos frugívoros y granívoros y con preferencia por los tejidos radiculares (Dicke, 2009). Además, las plantas pueden emitir compuestos volátiles en respuesta a la ovoposición de un herbívoro (Hilker y Meiners, 2006) y como consecuencia de la percepción de compuestos volátiles provenientes de



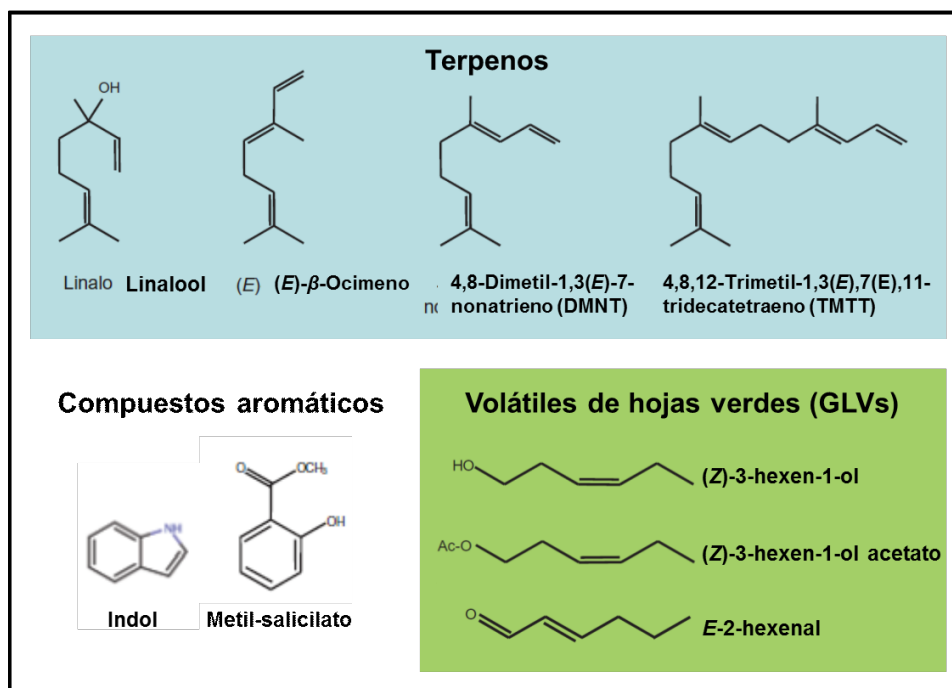
plantas vecinas ya infestadas con herbívoros (Kessler *et al.*, 2006). El daño producido por un herbívoro genera un gran rearrreglo transcripcional en la planta infestada, esto incluye la inducción de genes involucrados en la biosíntesis de fitohormonas y metabolitos secundarios (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5.** Interacciones tritróficas mediada por compuestos volátiles. El daño en el tejido producido por el herbívoro (1) (7), sumado a las secreciones orales activan la síntesis de ácido jasmónico (JA) (2) por la vía de las oxilipinas. El JA induce la producción y liberación de HIPVs (compuestos volátiles de plantas inducidos por herbivoría) (3) tanto en las hojas dañadas como en las sanas aledañas. Estos HIPVs que no son más que compuestos volátiles orgánicos (VOCs) atraen a enemigos naturales, como avispas parasitoideas, predadores y aves insectívoras (4). Las plantas vecinas (5) pueden percibir los VOCs emitidos por las plantas dañadas y "pre-activar" sus defensas de manera de estar listas ante el inminente ataque de una plaga, fenómeno conocido como *priming*. Los VOCs liberados también pueden atraer o repeler a herbívoros con- y heteroespecíficos respectivamente (6). La emisión de HIPVs no está reservada solamente a la parte aérea de la planta (8), el daño producido por larvas de escarabajo en la raíz induce la liberación de VOCs como (*E*)-cariofileno que atrae a nemátodos entomopatógenicos (9). El daño local producido en la parte aérea o en la raíz de la planta genera una señal sistémica (10), que viaja a toda la planta e induce la producción y liberación de HIPVs.

Una planta infestada puede emitir *blends* de HIPVs con decenas o centenas de compuestos volátiles diferentes. El *blend* de HIPVs emitidos está

compuesto mayoritariamente por alcoholes, ésteres, aldehídos, compuestos aromáticos y varios terpenos (**Figura 1.6**). En una escala temporal los primeros compuestos emitidos son los denominados volátiles de hojas verdes (GLVs), compuestos de seis carbonos, alcoholes y aldehídos en su mayoría; luego, en una ventana de tiempo de 24 horas, son emitidos los ésteres y terpenos (Pichersky y Raguso, 2016)



**Figura 1.6.** Volátiles del *headspace*. Esquema de los compuestos volátiles más representativos presentes en el *head-space* de varias especies de plantas posterior al ataque de un herbívoro. Imagen traducida de Dicke (2009).

Similar a lo que ocurre con los vinos, donde el *bouquet* de aromas está definido por su varietal y el *terroir* donde crece la vid, el *blend* de HIPVs emitido está definido por la especie y genotipo de la planta; los factores ambientales a los cuales está expuesta la planta; el estadio del insecto invasor; y el mecanismo que el insecto utiliza para dañar a la planta (masticador, succionador, ovoposición, etc.) (Ozawa *et al.*, 2000; Hoballah *et al.*, 2002; Heil, 2008a; Cortes *et al.*, 2016). El *blend* de compuestos volátiles será moldeado de acuerdo al tipo de ataque y a la fenología de la planta, lo que le dará la oportunidad de ajustar

sus defensas y reclutar al enemigo natural más apropiado (Heil, 2008a; Silva *et al.*, 2017).

## 1.6 Activación de las defensas por la vía del Ácido Jasmónico

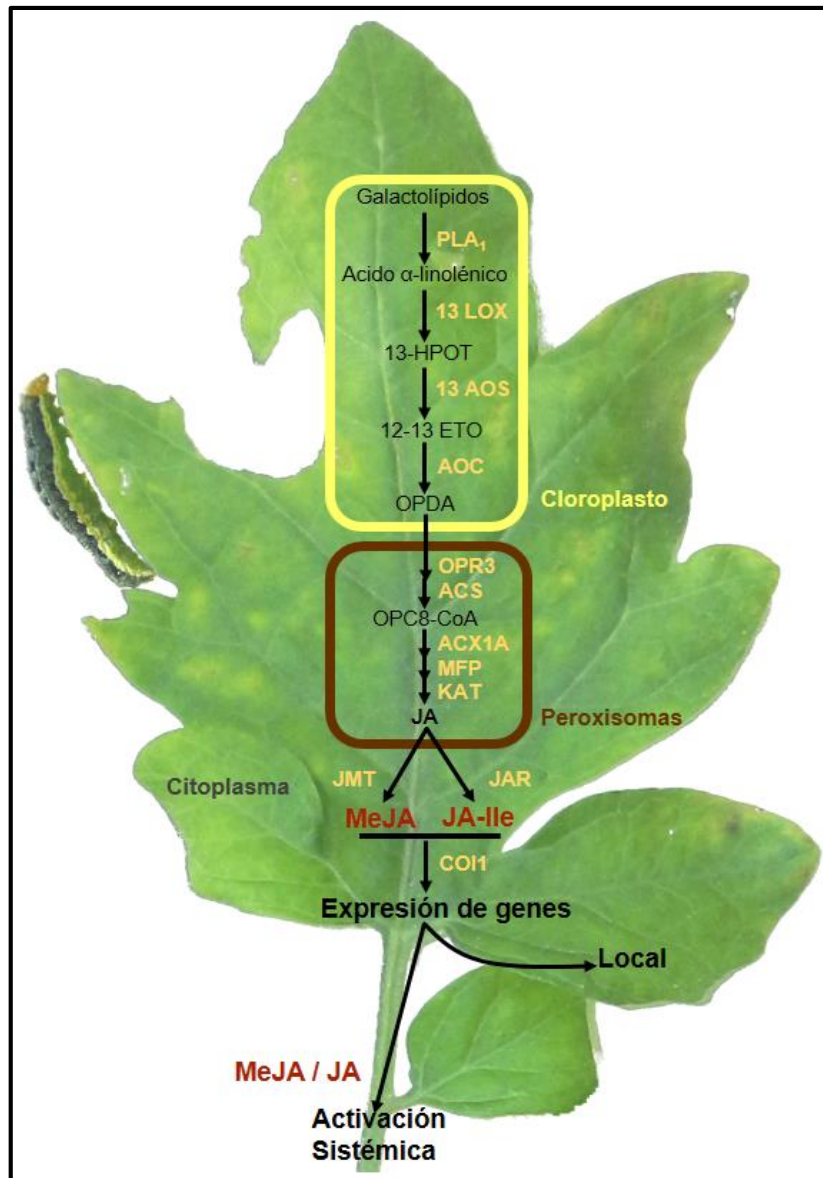
Parte del sistema de defensa que hemos descripto en las secciones anteriores operan a nivel constitutivo. Otros, como la emisión de HIPVs forman parte de la vía general de defensas inducibles en la que el ácido jasmónico (JA) juega un rol central. Los mecanismos de respuesta que involucran al JA se inician como consecuencia del ataque. La destrucción del tejido, aéreo o subterráneo, sumado a las secreciones orales del insecto son el punto de partida para la activación de las defensas (**Figura 1.5 (1)**). Los insectos herbívoros son detectados por las plantas al percibir patrones moleculares asociados al daño y a la herbivoría (DAMPs y HAMPs, *damage-associated molecular patterns* y *herbivore-associated molecular patterns*) (Keinanen *et al.*, 2001; Howe y Jander, 2008; Bonaventure, 2012; Erb *et al.*, 2012; Heil *et al.*, 2012). Se han identificado múltiples HAMPs entre los que se encuentran los ácidos grasos conjugados con aminoácidos (FACs, *Fattyacid–Amino acid Conjugates*) (Alborn *et al.*, 1997), caeliferinas, inceptinas, oligourónidos, glucosa oxidasa,  $\beta$ -glucosidasa, y lipasas (Bonaventure, 2012; Erb *et al.*, 2012). Los FACs son las señales de insectos mejor caracterizadas y están presentes en las secreciones orales de la mayoría de las larvas de lepidópteros (Yoshinaga *et al.*, 2010). Se sintetizan a partir de ácidos grasos producidos por las plantas (tales como los ácidos linolénico y linoléico) que se conjugan con glutamina o ácido glutámico. Los FACs no son sintetizados por las plantas por lo que proporcionan una buena señal de que están siendo atacadas por un herbívoro. Los receptores de los FACs (así como los de todos los demás HAMPs) aún no han sido identificados, tampoco queda claro si estos receptores reconocen directamente los HAMPs o algunos de sus derivados metabólicos (Bonaventure, 2012).

Si bien existen variaciones entre las distintas especies en cuanto a la diversidad de genes y enzimas implicados, el mecanismo general de síntesis de JA se encuentra ampliamente conservado (**Figura 1.7**). La biosíntesis del JA comienza con la liberación de ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3) de los galactolípidos presentes en la membrana de los cloroplastos y luego de ser oxidado por la enzima LOX (13-lipoxigenasa) pasa a 13(S)-HPOT [ácido 13(S)-hidroperoxi-

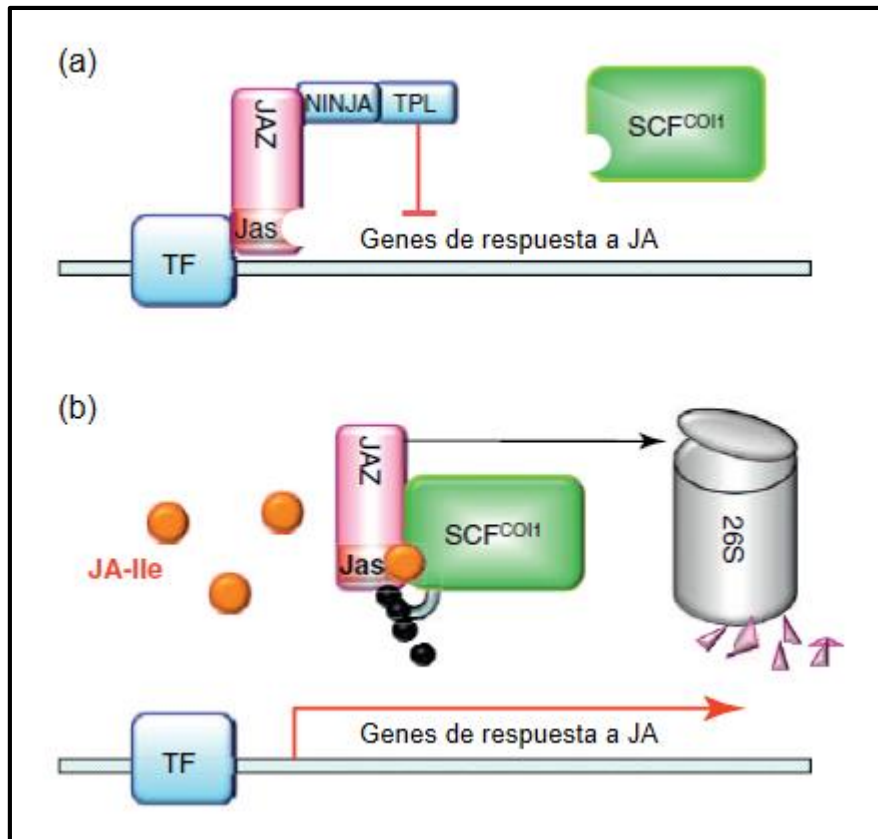
octadecatrienoico], el cual puede ser metabolizado para formar distintas clases de oxilipinas (Feussner y Wasternack, 2002; Mosblech *et al.*, 2009). Las 13-lipoxigenasas juegan un rol importante en los pasos iniciales de la síntesis de JAs. En *Solanum lycopersicum* se conocen hasta el momento cinco genes que codifican para 13-lipoxigenasas (*LOXA*, *LOXB*, *LOXC*, *LOXD* y *LOXE*) (Chen *et al.*, 2004). De los cinco genes identificados, la LIPOXIGENASA D (*LOXD*) es la principal responsable de la acumulación de JA en respuesta a herbivoría. Existe evidencia de que la sobreexpresión de *LOXD* en plantas de tomate confiere una mayor inducción de genes involucrados en defensa y son más resistentes al daño por herbivoría (Yan *et al.*, 2013a). En el paso siguiente, el 13(S)-HPTO es transformado a 12-13(S)-ETO [ácido 12-13(S)-epoxi-octadecatrienoico] por la enzima AOS (allene oxido sintasa) (Park *et al.*, 2002; von Malek *et al.*, 2002). Sobre este último producto actúa la enzima AOC (allene oxido ciclaza) dando lugar a OPDA [ácido (9S, 13S)-12-oxo-ftodienoico] estableciéndose de este modo la configuración estereoquímica natural del JA (Ziegler, 2000). El OPDA es el primer producto biológicamente activo de esta vía (Stenzel *et al.*, 2003; Wasternack, 2007), el que posteriormente migra de los cloroplastos a los peroxisomas donde la biosíntesis continúa hasta formar (+)-7-iso-JA. El JA está sujeto a diversas modificaciones enzimáticas originando de este modo numerosos metabolitos (Wasternack, 2007; Koo y Howe, 2012). Entre estos se incluye al JA conjugado con distintos aminoácidos, tales como la isoleucina. Esta conjugación forma JA-Ile que constituye la forma natural más activa de los JAs (Fonseca *et al.*, 2009). Además, el JA se puede conjugar con Leu, Val, Tyr, Trp y otras moléculas (Staswick y Tiryaki, 2004; Kramell *et al.*, 2005; Staswick, 2009). El JA puede sufrir otras transformaciones como la metilación o la glucosilación dando lugar a MeJA (Gfeller *et al.*, 2010) o JAG (Kourtchenko *et al.*, 2007) respectivamente. La interconversión entre las distintas formas en las que se puede presentar el JA parece constituir un mecanismo de activación - desactivación y por lo tanto jugar un rol durante la regulación de esta vía (Miersch *et al.*, 2008).

Recientemente se han hecho avances significativos en el conocimiento de los mecanismos de percepción de los JAs en las células vegetales (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007; Melotto *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009; Pauwels *et al.*, 2010; Sheard *et al.*, 2010) (**Figura 1.8**). Se ha demostrado

que la percepción de JA-Ile se logra mediante la interacción de JA-Ile con un co-receptor formado por la proteína COI1, un componente F-box (Xie *et al.*, 1998) de un complejo SCF (*SKIP-CULLIN-F-box*) que actúa como una E3 ubiquitinligasa (Zheng *et al.*, 2002) y las proteínas JAZ (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). El JA-Ile estimula la unión específica de COI1 con las proteínas JAZ lo que conduce a una ubiquitinación de las JAZs por el complejo SCFCOI1 y su posterior degradación por el proteasoma 26S. Al degradarse las proteínas JAZ se logra activar la vía de los JAs mediante una reprogramación transcripcional de la célula (Pauwels y Goossens, 2011; Kazan y Manners, 2012; Shyu *et al.*, 2012) (**Figura1.7**). La transcripción de los genes de respuesta a los JAs, impulsada por el ataque de herbívoros, infecciones de patógenos o daño conduce a la producción de metabolitos de defensa tanto en los órganos afectados directamente como en los no afectados. Estas respuestas les proporcionan a las plantas una protección sistemática contra futuros ataques (Howe y Jander, 2008; Koo *et al.*, 2009). El JA y el MeJA (metil-jasmonato) funcionan como mensajeros en la señalización a distancia para la activación de defensas (Bozorov *et al.*, 2017).



**Figura 1.7.**Modelo general de la biosíntesis del ácido jasmónico (JA). El daño en el tejido producido por el ataque de un insecto activa la biosíntesis de JA a partir de ácido α-linolénico liberado por la fosfolipasa A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) a partir de los galactolípidos presentes en la membrana del cloroplasto. La biosíntesis de JA involucra enzimas del cloroplasto, PLA<sub>1</sub> (fosfolipasa A<sub>1</sub>), 13 LOX (13-lipoxigenase), AOS (allene oxido sintasa), (AOC) allene oxido ciclasa); peroxisoma, OPR3 (OPDA reductasa3), ACS (acil-CoAsintetasa), ACX1 (acil-CoA-oxidasa1), MFP (*multifunctionalprotein*), KAT (3-cetoacil-CoA tiolasa), y citosol, JAR1 (JA-amino ácido sintetasa), JMT (carboximetiltransferasa). 13(S)-HPOT [ácido 13(S)-hidroperoxi-octadecatrienoico], 12-13(S)-ETO [ácido 12-13(S)-epoxi-octadecatrienoico], OPDA [ácido (9S, 13S)-12-oxo-ftodienoico], OPC-8 [ácido 3-oxo-2-(2-pentenil)-ciclopentano1-octanoico].



**Figura 1.8.** Modelo actual de percepción de JA y activación de genes de respuesta. Activación de la vía de JA en respuesta a la degradación de proteínas represoras JAZ a) en ausencia de JA bioactivos, los genes de respuesta a JA están reprimidos debido a la interacción de los factores de transcripción (TF) con proteínas represoras JAZ, las que controlan la expresión de genes a través de su interacción con el adaptador NINJA y las proteínas co-represoras TPL (Pauwels *et al.*, 2010), y presumiblemente a través de otros mecanismos de represión(Howe, 2010) b) En presencia de JA bioactivos (que se producen en respuesta al ataque de herbívoros, círculos naranjas) las proteínas JAZ interactúan vía su dominio Jas con la ubiquitín-ligasa SCFCOI1, lo que las marca para degradación en el proteasoma 26S, y des-reprime así la transcripción de los genes de respuesta. Editado de Ballare (2011).

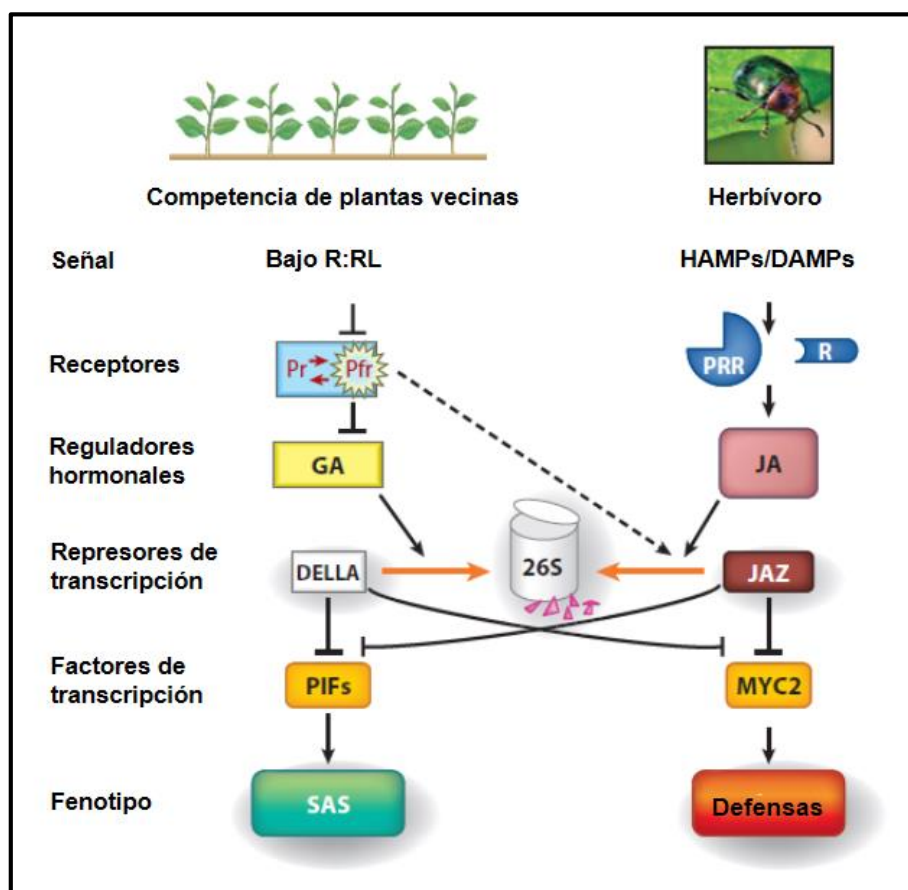
### 1.7 El dilema de las plantas. ¿Crecer o defenderse?

Bajo condiciones de competencia intra- e interespecífica y la necesidad de defender los tejidos frente al ataque de herbívoros y patógenos, las plantas intolerantes al sombreado han estado expuestas a fuerzas selectivas importantes durante su evolución. Las plantas pueden ajustar la inversión de energía destinada a defensas en función del riesgo de competencia por la luz

con sus vecinas. En ensayos realizados en pepino, tomate, *Nicotiana attenuata* y *Arabidopsis*, se ha observado que las bajas relaciones R:RL y la consecuente activación del SAS está correlacionada con una reducción de la expresión de genes marcadores de defensa y con un incremento en la vulnerabilidad a insectos herbívoros y patógenos necrótrofos (McGuire y Agrawal, 2005; Izaguirre *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2009; Cerrudo *et al.*, 2012; Cortes *et al.*, 2016). Este compromiso de asignación de recursos es a menudo conocido como el "dilema de las plantas" (Herms y Mattson, 1992; Cipollini *et al.*, 2004; Ballare, 2009). Así, las plantas deben crecer lo suficientemente rápido como para ser competitivas con sus vecinos y, al mismo tiempo, asignar recursos a la defensa para poder sobrevivir en ambientes donde existen organismos consumidores. ¿Cómo hacen las plantas para balancear sus recursos entre crecer y defenderse? Uno de los posibles mecanismos involucra cambios en el balance de proteínas DELLA y JAZ (**Figura 1.9**).

La vía de señalización del JA se encuentra regulada por la interacción de dos familias de represores transcripcionales: DELLA y JAZ. Las proteínas JAZ (*Jasmonate-ZIM domain*) son represores de la señalización del JA, ya que interfieren con los factores de transcripción responsables de la activación de esa vía. Por su parte, las proteínas DELLA son represoras de las respuestas por giberelinas (GA), e interaccionan físicamente con las proteínas JAZ disminuyendo su disponibilidad para reprimir la vía del JA. Las giberelinas promueven el crecimiento y reprimen las defensas, ya que promueven la degradación por el proteosoma de las proteínas DELLA, por su parte el JA reprime el crecimiento y activa las defensas al promover la degradación de las proteínas JAZ por el proteosoma. Existe evidencia que sugiere que las bajas relaciones R:RL inclinan el balance DELLA-JAZ a favor de las proteínas JAZ, promoviendo la degradación de las DELLA y aumentando la estabilidad de JAZ (Leone *et al.*, 2014). Este cambio en el balance DELLA-JAZ, acompañado por algunos efectos específicos de las bajas relaciones R:RL sobre los factores de transcripción MYC, encargado de activar la respuesta inducida por JA, resultan en una redistribución de recursos hacia un rápido crecimiento y defensas atenuadas (Ballare, 2014; Mazza y Ballare, 2015)





**Figura1.9.** Esquema conceptual de las conexiones potenciales entre el phyB y la señalización de los JAs en la modulación de defensas en respuesta a la proximidad de plantas vecinas. La inactivación del fitocromo B (phyB) por bajas R:RL regula negativamente las defensas inducidas alterando el balance entre las proteínas DELLA y los represores JAZ. Editado de Ballare (2014).

## 1.8 Interacción de la radiación RL con las defensas indirectas

Existe poca evidencia sobre cómo los factores ambientales pueden regular la emisión de VOCs (Kegge y Pierik, 2010; Mumm y Dicke, 2010; Pierik *et al.*, 2014). Sin embargo, esta sugiere que la emisión de la gran mayoría de los VOCs involucrados en las defensas anti-herbívoro están controlados por el JA (Arimura *et al.*, 2005; Mumm y Dicke, 2010; Ponzio *et al.*, 2013). Dado que el phyB es un importante modulador de la señalización del JA (Ballare, 2014), es razonable pensar que los compuestos volátiles emitidos por las plantas en respuesta al ataque de un herbívoro se vean afectados por la calidad de luz percibida en el ambiente. En trabajos recientes realizados en *Arabidopsis*,

cebada y tomate, se ha observado que las bajas R:RL y el sombreado de la canopia modifica el *blend* de volátiles emitido por plantas tratadas con metil jasmonico (MeJA) (Kegge *et al.*, 2013; Kegge *et al.*, 2015). Sin embargo, las consecuencias ecológicas de estas alteraciones, y sus implicancias en el contexto de las estrategias de defensa empleadas por plantas en condiciones de competencia, han sido muy poco exploradas (Pierik *et al.*, 2014).

## 1.9 Objetivos e hipótesis de trabajo

El objetivo general de la presente tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas es contribuir al conocimiento y entendimiento de los efectos de los cambios en el ambiente lumínico sobre las defensas anti-herbívoro y las interacciones con otros niveles tróficos.

El modelo de trabajo utilizado en esta tesis se basa en la hipótesis general que la proximidad de plantas vecinas genera una reducción en los sistemas de defensa directos, la cual podría verse parcialmente compensada por la activación de sistemas de defensa indirectos basados en la emisión de VOCs. La presente tesis se centra en la utilización de *Solanum lycopersicum* como planta de estudio, por su importancia agronómica y como modelo de estudio de plantas de fruto de pulpa, y en la región R y RL del espectro solar debido a la importancia que posee como señal de competencia durante el crecimiento y desarrollo de la planta.

Para el desarrollo de la presente tesis se utilizaron plantas *wild-type* (WT) y doble mutante de fitocromo B (phyB1phyB2) cultivadas en invernáculo bajo radiación natural. Adicionalmente un grupo de plantas WT fue suplementada en con radiación rojo lejano (RL), de manera de inactivar el fitocromo B (phyB) por una aproximación fisiológica. En todos los ensayos realizados se utilizó metil-jasmonato (MeJA) como inductor de las defensas.

A continuación se mencionan los objetivos específicos planteados en esta tesis doctoral:

- Determinar el efecto de la radiación RL sobre la modulación e inducción de las defensas directas anti-herbívoro mediadas por JA.

- Evaluar el efecto del fitocromo B sobre el *blend* de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) involucrados en las defensas indirectas.
- Estudiar de qué manera las bajas relaciones R:RL percibidas por la planta afectan otros niveles tróficos.

Para poder alcanzar los objetivos propuestos se plantean las siguientes hipótesis:

**H1. La inactivación del fitocromo B desencadena el síndrome de escape al sombreado (SAS), y resulta en una atenuación de las defensas estructurales.** En base a esta hipótesis esperaríamos que plantas que tienen el phyB inactivo, tengan un menor número de tricomas y hojas más finas como consecuencia de una redistribución de recursos hacia un mayor crecimiento y desarrollo de órganos fotosintéticos

**H2. Las plantas expuestas a una baja relación R:RL presentan un nivel de defensas química disminuido y una baja inducción de las mismas ante el ataque de un herbívoro.** Teniendo en cuenta las investigaciones realizadas en nuestro grupo las bajas relaciones R:RL producen una desensibilización al MeJA (Leone *et al.*, 2014), con lo cual esperaríamos que las plantas sometidas a baja R:RL presenten bajos niveles de defensas químicas y ante un ataque de un herbívoro su inducción sea menor que la de plantas creciendo en un ambiente abierto.

**H3. La inactivación del fitocromo B en plantas inducidas con MeJA altera el *blend* de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos.** En base a esta hipótesis esperaríamos que plantas que tienen el phyB inactivo y son inducidas con MeJA, presenten cambios cuali y cuantitativos en el *blend* de VOCs emitidos en comparación con plantas *wild-type*.

**H4. La inactivación del fitocromo B produce un *switch* de defensas directas hacia indirectas.** En base a esta hipótesis esperaríamos que las plantas que poseen el fitocromo B inactivo, ante un evento de herbivoría desplieguen un

mecanismo indirecto de defensa, en el cual su puesta en marcha atraiga a individuos de cadenas tróficas superiores a que la defiendan.



# **Capítulo 2**

## **Materiales y métodos**

## Capítulo 2

### Materiales y Métodos

#### 2.1 Materiales

##### 2.1.1 Material vegetal

Para la realización de todos los ensayos de la presente tesis se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar *MoneyMaker* (número de accesión LA2706), como genotipo “wild-type” (WT) y un doble mutante de fitocromo B1 y B2, *phyB1phyB2* en un *background* del cultivar *MoneyMaker* (Weller *et al.*, 2000). Las semillas fueron gentilmente provistas por el Dr. Richard Kendrick (Laboratorio de Fisiología Vegetal, Universidad de Wageningen).

##### 2.1.2 Insectos

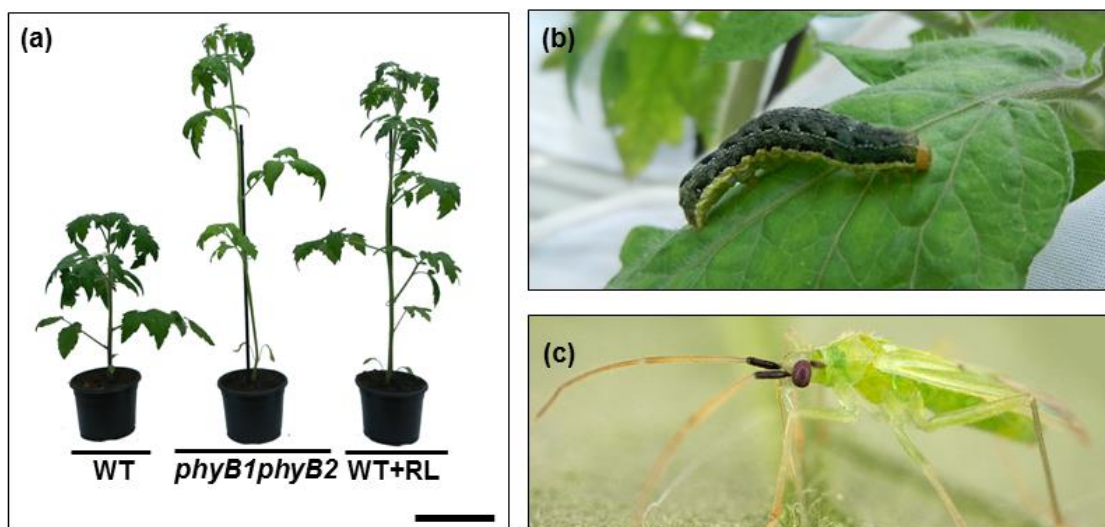
###### 2.1.2.1 *Mamestra brassicae*

Las orugas de *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) utilizadas en los ensayos de herbivoría fueron obtenidas de colonias stock del Laboratorio de Entomología de la Universidad de Wageningen. Estas orugas fueron criadas sobre plantas de repollo de Bruselas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* cv Cyrus) en una sala con control de temperatura, humedad y fotoperíodo ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 5\%$  HR, 16-horas de luz).

###### 2.1.2.2 *Macrolophus pygmaeus*

Las ninfas y adultos del predador *Macrolophus pygmaeus* Rambour (Hemiptera: Miridae) fueron provistas por la compañía Koppert Biological Systems (Berkel en Rodenrijs, Países Bajos). Durante su cría en la compañía, el predador nunca estuvo en contacto con ningún tipo de planta y fueron

alimentados con huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Una vez en el laboratorio, los predadores fueron acondicionados en cajas (60x 40 x 40 cm) conteniendo dos plantas de tomate, una de cada genotipo, y huevos de *E. kuehniella* como alimento. Luego estas cajas fueron ubicadas dentro de cámaras de cultivo con control de temperatura, humedad y fotoperíodo ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  HR, 16 horas de luz) donde fueron conservadas hasta el momento de la realización de los ensayos.



**Figura 2.1.**Material vegetal e insectos utilizados. En (a) se puede observar los genotipos de plantas de tomate utilizados para todos los ensayos así como también el fenotipo de una planta *wild-type* tratada con radiación rojo lejana. En (b) y (c) se pueden observar al herbívoro *Mamestra brassicae* y al predador *Macrolophus pygmaeus* respectivamente.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Condiciones de cultivo

Previo a la siembra las semillas de *Solanum lycopersicum* fueron higienizadas con hipoclorito de sodio al 10% durante 1 minuto con agitación y posteriormente enjuagadas con agua destilada. La siembra se realizó en bandejas plásticas de 50 celdas de  $95\text{ cm}^3$  cada una, con un sustrato constituido por una mezcla de tierra y perlita (3:1). Las bandejas se colocaron en una cámara de cultivo con temperatura controlada ( $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) y un fotoperíodo de



luz/oscuridad de 12 horas cada uno y  $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Una semana después de germinar, los plantines fueron trasplantados a macetas de 3 litros, con un sustrato idéntico al utilizado en la siembra, y fueron colocadas en un invernáculo con control de temperatura ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 10\%$  HR) bajo radiación natural, con una intensidad máxima de PAR de  $800\text{-}1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Durante la fase de cultivo las plantas fueron regadas con agua corriente cada dos días y fertilizadas 1 vez a la semana con una solución de  $1 \text{ gr l}^{-1}$  de Hakaphos Rojo (COMPO EXPERT, Munich, Alemania). Bajo estas condiciones las plantas fueron cultivadas durante 4 semanas y sometidas a distintos tratamientos, detallados en las siguientes secciones. Los ensayos realizados para esta tesis fueron desarrollados en dos locaciones diferentes; el Instituto de Biología Agrícola de Mendoza, IBAM-CONICET, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina ( $33^\circ 0' \text{ S}$  and  $68^\circ 52' \text{ W}$ ) y el Laboratorio de Entomología, Wageningen UR, Países Bajos ( $51^\circ 59' \text{ N}$   $5^\circ 39' \text{ E}$ ). En ambas locaciones la metodología y condiciones de cultivo se mantuvieron idénticas.

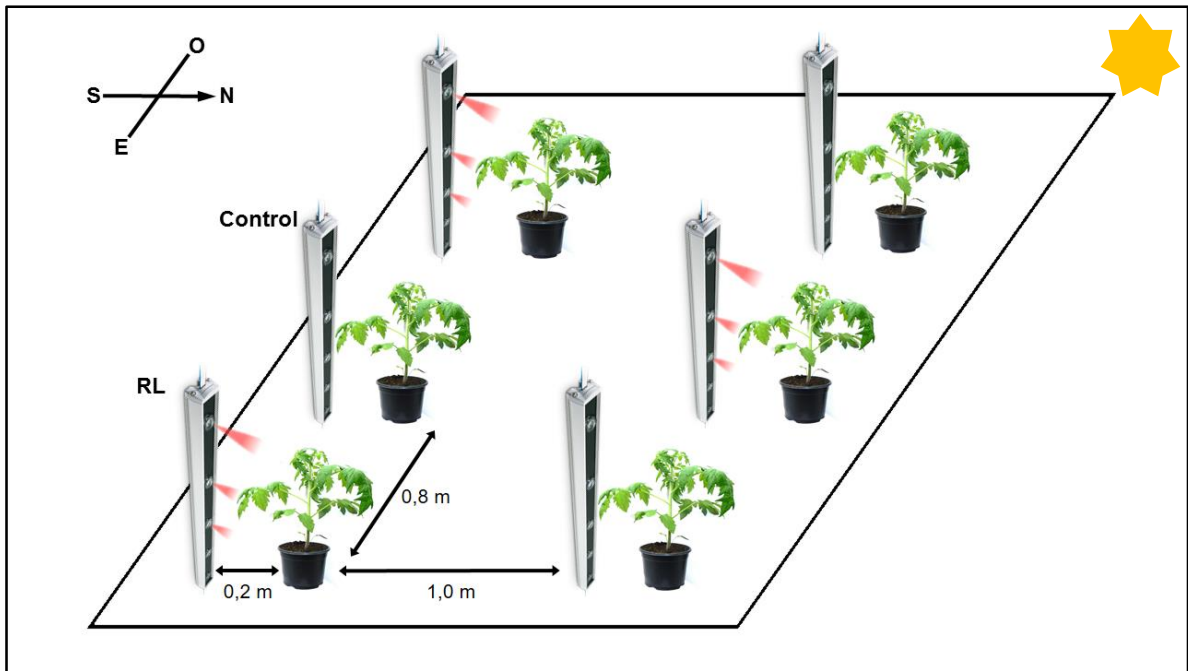
### **2.2.2 Tratamiento lumínico con radiación rojo lejano. Simulación de presencia de plantas vecinas.**

El grupo de plantines *wild-type* provenientes de la cámara de cultivo, una vez trasplantados, se colocaron en el invernáculo y luego de dos días de aclimatación se dividieron en dos sub-grupos. Un sub-grupo se expuso a una fuente lateral de radiación rojo lejano (RL) proveniente de fuentes de LEDs (730 nm; Philips Green Power, 50 cm, Eindhoven, Países Bajos; 1 barra por planta) situada en posición vertical en el lado sur de la maceta (Tratamiento RL), durante el fotoperiodo natural. Las plantas restantes que conformaban el otro sub-grupo (Tratamiento Ambiente) se acomodaron de manera similar al anterior pero con barras de LEDs que permanecieron apagadas durante todo el experimento. Las barras de LEDs RL reducen la relación R:RL de 1,1 (Tratamiento Ambiente) a 0,1 (Tratamiento RL) (medido con el sensor mirando al sur). Este tratamiento se prolongó durante las 4 semanas que las plantas estuvieron alojadas en el

invernáculo. Las plantas doble mutante de fitocromo B *phyB1phyB2*, no fueron irradiadas con radiación RL.

### **2.2.3 Simulación de herbivoría por tratamiento con MeJA exógeno**

Para la inducción de defensas por simulación de herbivoría se utilizó la fitohormona metil jasmonato (MeJA), (Sigma, St. Louis, Estados Unidos). Las plantas cultivadas en el invernáculo durante 4 semanas se rociaron completamente (aproximadamente 50 ml por planta) con soluciones de concentración 100 y 450  $\mu$ M. Para facilitar la disolución del MeJA las soluciones fueron preparadas con etanol absoluto en una concentración de 4% en agua MilliQ. Las plantas control se rociaron con 50 ml de una solución acuosa de etanol absoluto 4%. No se observaron alteraciones en el crecimiento de las plantas debido al tratamiento con MeJA. Cuando las plantas se trataron con las respectivas soluciones de MeJA, los grupos control fueron apartados y colocados en el extremo opuesto del invernáculo corriente arriba del sistema de ventilación para evitar cualquier tipo de contacto con los vapores de MeJA. Pasadas 3 horas, y cuando no se observaron restos acuosos en su superficie, las plantas control se distribuyeron nuevamente a su posición original dentro del invernáculo. Para el análisis de expresión de genes y las determinaciones de terpenos en hoja, el material vegetal se cosechó a 8 y 24 horas post-inducción e inmediatamente se colocó en N<sub>2</sub> líquido para luego ser conservado en un freezer vertical a -80°C hasta el momento de los análisis. Para las determinaciones de compuestos fenólicos en hoja, el material se cosechó a 72 horas post-inducción e inmediatamente se colocó en N<sub>2</sub> líquido para posteriormente ser liofilizado (FreeZone 2.5 Liter Benchtop, Labconco, Kansas City, Misuri, Estados Unidos) durante 48 horas. Para las determinaciones de compuestos volátiles en el *head-space* y los ensayos de comportamiento en el olfatómetro en Y se utilizaron plantas completas a las 24 horas de haber sido inducidas.



**Figura 2.2.** Esquema de cultivo. Las plantas de tomate fueron cultivadas bajo radiación natural (control) y en algunos casos suplementadas con radiación RL con tubos de LEDs. El cultivo se desarrolló en invernáculo a temperatura y humedad controlada.

## 2.2.4 Cuantificación de tricomas

### 2.2.4.1 Cuantificación de tricomas de tallo por fotografía digital

La cuantificación de tricomas tipo I en tallo se realizó a partir de fotografías tomadas en el tercer entrenudo con una cámara digital (Nikon Tokio, Japón). Se tomaron dos fotografías por planta con  $90^\circ$  de diferencia entre una y otra con el fin de tener dos planos diferentes del entrenudo. La cuantificación en ambas fotos se realizó promediando el número de tricomas del lado izquierdo y derecho del tallo y luego se dividió por una unidad de longitud de referencia. Los resultados se expresaron como número de tricomas por cm. Se utilizaron 10 plantas por cada tratamiento.

#### **2.2.4.2 Cuantificación de tricomas totales en hoja e índice de tricomas**

La determinación de la densidad de tricomas totales se realizó por microscopia óptica mediante improntas de epidermis. Las improntas de hoja se realizaron pintando con esmalte de uñas transparente una superficie de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> sobre la cara adaxial del foliólulo terminal de la quinta hoja. Una vez seco el esmalte, se cortó el foliólulo y se pegó la película de esmalte sobre una cinta bifaz pegada a un porta objeto. Se retiró el resto de material vegetal y la impronta se protegió con un cubre objeto. La cuantificación de tricomas totales por unidad de área se realizó a partir de fotografías tomadas con una cámara digital (Micrometrics 318 CU Camera, Shangai, China) acoplada a un microscopio óptico (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japón). Los resultados se expresaron como número de tricomas totales por cm<sup>2</sup>. De esta misma manera se cuantificó el índice de tricomas como la relación entre el número total de tricomas dividido por el número total de células presentes en la epidermis (epidérmicas, estomas, tricomas, etc.)

#### **2.2.4.3 Cuantificación e identificación de los diferentes tipos de tricomas en hoja por microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La cuantificación de los distintos tipos de tricomas por microscopia electrónica de barrido se realizó utilizando la metodología descrita por Kang *et al.* (2010b) con algunas modificaciones. Discos de hoja de 1 cm<sup>2</sup> fueron colocados en una solución buffer 0,1 M de cacodilato de sodio (pH 7,4) utilizando paraformaldehído y glutaraldehído (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania), en una concentración del 2,5%, como agentes de fijación. Las muestras se conservaron durante 24 horas a 4°C y posteriormente se lavaron con una solución 0,1M conteniendo únicamente cacodilato de sodio. A continuación se deshidrataron durante 12 horas (2 horas por solución) utilizando una serie creciente de soluciones de acetona (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina) de 10, 20, 40, 60, 80 y 100%. Finalmente, se secaron por punto crítico con CO<sub>2</sub> (DCP-1, Denton Vacuum, Moorestown, Estados Unidos) y se montaron sobre *studs* metálicos donde se cubrieron con una película de oro de 30 nm (Desk IV, Denton Vacuum,

Moorestown, Estados Unidos). Las muestras se observaron en un microscopio de barrido JEOL- 6610LV (Tokyo, Japón) con un voltaje de aceleración de 30 kV y las imágenes resultantes se capturaron de manera digital.

#### **2.2.5 Cuantificación de la masa foliar por unidad de área (LMA)**

La cuantificación de la masa foliar por unidad de área (LMA) se realizó a partir de diez discos de hoja de 1cm<sup>2</sup> de diámetro, tomados de todas las hojas de la planta de manera aleatoria y evitando la nervadura central de la hoja. Posteriormente se colocaron en sobres de papel madera y se secaron en una estufa a 60°C durante 48 horas. El cálculo de LMA se realizó dividiendo por diez el peso del conjunto de discos y los resultados se expresaron en mg cm<sup>-2</sup>.

#### **2.2.6 Determinación de compuestos fenólicos solubles por HPLC**

Los compuestos fenólicos individuales fueron determinados por HPLC utilizando la metodología descrita por Keinänen *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Entre 10 y 15 mg de tejido liofilizado por muestra (excluyendo la nervadura central) fueron homogeneizados en mortero y resuspendidos en 1,5 ml de una solución de metanol-ácido acético 0,25% (2:3 v/v). Las suspensiones fueron agitadas en un vórtex durante 45 s y centrifugadas a 12000 rpm y 4°C durante 20 min. Los sobrenadantes se filtraron mediante filtros jeringa de Nylon de 45 µm y se almacenaron a -20°C. Los compuestos fenólicos individuales fueron separados y cuantificados mediante HPLC (Euroline, Knauer) utilizando una columna C18 (150 mm x 4,6, 5,0 µm; Pinnacle II, Restek) con solventes A (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,25% v/v en H<sub>2</sub>O MilliQ) y B (acetonitrilo). La elución de los compuestos de interés se realizó mediante un gradiente lineal de 8% B a 0 min, 12% B a 6 min, 20% B a 10 min, 50% B a 23 min hasta los 30 min y nuevamente 8% B entre los 30 y 40 min para volver a equilibrar la columna. El flujo de fase móvil se mantuvo constante a 1 ml min<sup>-1</sup>. El volumen de muestra inyectado fue de 20 µl y la elución se monitoreó con un detector de arreglo de diodos (DAD) a 305nm (compuestos fenólicos). Los distintos isómeros de ácido clorogénico y la rutina

fueron identificados mediante comparación de sus tiempos de retención y espectros UV-Vis con los de estándares comerciales (Sigma Aldrich, Munich, Alemania); las cantidades fueron cuantificadas en base a curvas de calibración y expresadas como  $\mu\text{mol}$  por gramo de tejido seco ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ).

## **2.2.7 Análisis de la expresión de genes vinculados a la defensa**

### **2.2.7.1 Extracción de ARN**

La extracción de RNA para la cuantificación relativa de la expresión génica se realizó siguiendo el método de LiCl-fenol/cloroformo descrito por Izaguirre *et al.* (2003). Aproximadamente 100 mg de tejido congelado por muestra fueron pulverizados en un mortero con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se resuspendió en tubos *ependorf* de 1,5 ml con una mezcla de 1 ml de buffer de extracción (0,18 M Tris-HCl pH 8,2; 0,09 M LiCl; 4,5 mM EDTA; 1% m/v SDS) y 0,34 ml de fenol ácido:cloroformo (Amersham Biosciences). La suspensión homogeneizada se centrifugó durante 20 min a 10.000 rpm y 4°C. El sobrenadante (aproximadamente 0,7 ml) se traspasó a un nuevo tubo y se le agregó igual volumen de cloroformo (para quitar restos de fenol). La mezcla se centrifugó nuevamente durante 20 min a 10.000 rpm y 4°C y a la fase acuosa resultante se le agregó una solución de LiCl hasta alcanzar una concentración final 2 M. Las muestras se mezclaron bien y los ácidos nucleicos se dejaron precipitar durante toda la noche a 4°C. Luego del paso de precipitación las muestras fueron centrifugadas 20 min a 10.000 rpm y 4°C. El precipitado se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O MilliQ y 40  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 3 M. Una vez resuspendidas las muestras, se agregaron 1,1 ml de etanol absoluto y se precipitaron los ácidos nucleicos incubando las suspensiones a -20°C por 2 h. Se realizó una nueva centrifugación a 10.000 rpm y 4°C durante 30 min y se lavaron los precipitados con 400  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto 70% v/v. Luego de una última centrifugación de 20 min a 10.000 rpm y 4°C, los precipitados se secaron a temperatura ambiente y fueron resuspendidos en H<sub>2</sub>O MilliQ.

### **2.2.7.2 Cuantificación de ARN**

La calidad y cantidad del ARN extraído fue estimado en un gel de agarosa 1%, para lo cual se realizó una corrida electroforética corta (durante 15-20 minutos) a 100 volts de 1 µg de ARN y se visualizó en el transiluminador con luz UV. Paralelamente, se midieron por espectrofotometría (UV-1700 series; Shimadzu) las absorbancias a 260 y 280 nm. Las concentraciones se calcularon sabiendo que 1 DO<sub>260nm</sub> de ARN= 40 mg/ml, teniendo en cuenta el factor de dilución. El índice de pureza se evaluó por la relación entre las densidades ópticas obtenidas a 260nm y 280nm, cuyo coeficiente aceptable se estima entre 1,8-2,1.

### **2.2.7.3 Tratamiento con ADNsa del ARN**

Par evitar que durante las reacciones de PCR se amplifique ADN co-purificado junto con el ARN, las muestras fueron tratadas con ADNsa mediante el siguiente protocolo: Se incubaron 2 g del ARN total con 2 l de ADNasa RQ1 (Promega) durante 30 min a 37°C. Luego las muestras se trataron durante 10 min a 65°C con ADNsa Stop Solution (Promega). El ARN total purificado se almacenó a -70°C.

### **2.2.7.4 Síntesis de ADNc por transcripción reversa**

Se utilizaron aproximadamente 2 µg del ARN total purificado para la síntesis de ADNc por PCR reversa, utilizando la retrotranscriptasa MMLV-RT (Promega). La mezcla de reacción contenía 1 µg de oligodT, 25 µM de mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 200 unidades de enzima y buffer de reacción (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT) en un volumen final de 25 µl. El ARN total fue incubado con los oligodT a 75°C durante 5 min. Luego se llevó a cabo la retrotranscripción en un único ciclo de 60 min a 42°C con un paso final de incubación de 15 min a 70°C para eliminar cualquier traza de actividad de DNasa. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

### 2.2.7.5 Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real (RTq-PCR)

El ADNc resultante fue usado como molde para la amplificación de genes específicos por medio de un termociclador (7500 PCR Real System, Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos). Los oligonucleótidos fueron diseñados usando el software Primer Express 1.5 (Applied Biosystems) o bien tomados de la bibliografía (Cuadro 2.1). Las reacciones de PCR fueron realizadas usando SYBR Green Master Mix (ROCHE) con los oligonucleótidos listados más abajo a una concentración final de 500 nM cada uno y 1,0 µl de 50% (v/v) ADNc como templado. Las condiciones de ciclado de la PCR consistieron en un paso inicial de activación de la polimerasa a 94°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 94° C durante 15 seg. y 1 min a 60° C. Los niveles de expresión del gen *SGN-U346908* fueron utilizados como control endógeno para normalizar diferencias entre muestras debidas a variaciones en la cantidad de templado. Los niveles de expresión génica normalizados para cada gen de interés fueron expresados como niveles de expresión relativa respecto del tratamiento control.

Gen	Oligonucleótido	Referencia
<b><i>SGN-U346908</i></b>	Fwd GCTAAGAACGCTGGACCTAATG Rev TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	(Exposito-Rodriguez <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>PIN-II</i></b>	Fwd GCTGTTTCAAGGAAGTTAATTTTGT Rev ACAAGCCTTGGCATCAACATATAG	Diseño propio
<b><i>LOXA</i></b>	Fwd GAATTGAGTTTGCCACATCCAG Rev AACACCAGAGTCATTACCG	Diseño propio
<b><i>LOXD</i></b>	Fwd GACTGGTCCAAGTTCACGATCC Rev ATGTGCTGCCAATATAAATGGTTCC	Diseño propio
<b><i>TD</i></b>	Fwd AAGACGGGCTCAAATACATCC Rev AACACCAGCTATCAAACCCC	Diseño propio
<b><i>PPOF</i></b>	Fwd TGATCCAGAACCAGGCATG Rev TGGTGACAGTAGAAAAGCGG	(Fujimoto <i>et al.</i> , 2011)

**Tabla 2.1.** Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para PCR. *PIN-II*, Proteinase Inhibitor II; *LOXA*, lipoxigenasa A; *LOXD*, lipoxigenasa D; *TD*, treonina deaminasa; *PPOF*, polifenol oxidase F.



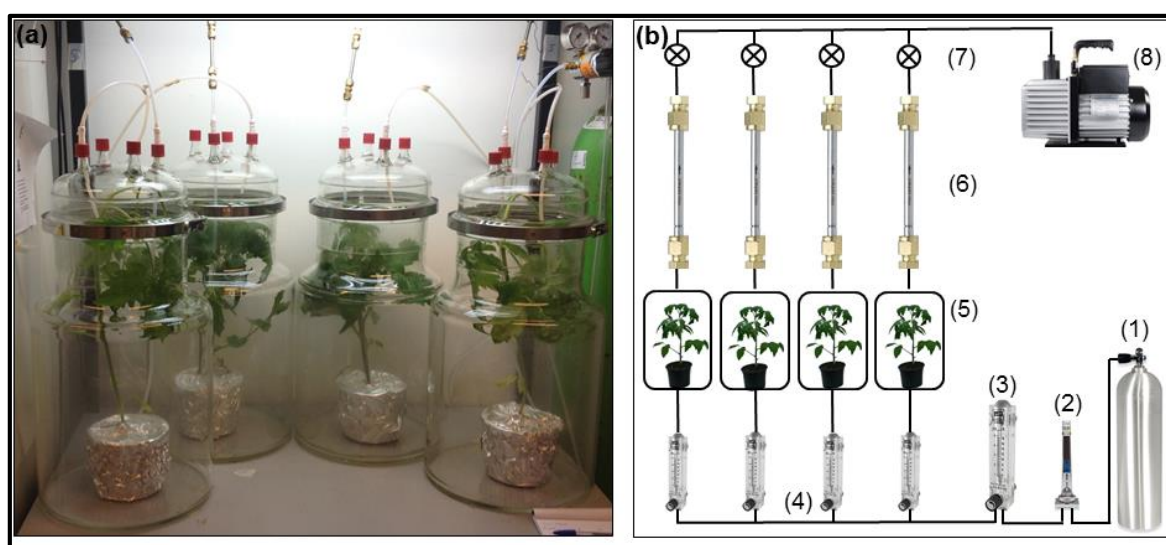
### 2.2.8 Determinación de terpenos presentes en tejido foliar

La identificación y posterior cuantificación de terpenos en hoja se realizó según lo descrito por Kang *et al.* (2010b), con algunas modificaciones menores. El contenido de los tricomas de hoja se colectó mediante la técnica de *leaf dip* (inmersión de hoja). Para la extracción se cortó el foliólulo terminal de la cuarta hoja, se cuantificó su área y peso fresco, y posteriormente se incubó en un 1 ml de solvente metil ter-butil éter dopado con una solución 1 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  de estándar interno, *n*-hexadecano, durante 5 minutos con agitación suave. A continuación se retiró el material vegetal y se inyectó una alícuota de 2  $\mu\text{l}$  del extracto remanente en una columna capilar (Elite-5MS, 30 m (longitud), 0,25 mm (diámetro interno), 0,25  $\mu\text{m}$  (espesor del film, FT); Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) incorporada a un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masas (GC-EIMS, Clarus 500, Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, Estados Unidos). La temperatura inicial del horno del GC fue seteada a 45 °C por 1 minuto y luego se incrementó a una tasa de 2°C  $\text{min}^{-1}$  hasta los 130°C y posteriormente a 20°C  $\text{min}^{-1}$  hasta los 250°C donde se mantuvo por 10 minutos. El potencial de ionización que se utilizó fue de 70 eV con un escaneo completo de masas en el rango de los 40 a 500 amu (*atomic mass unit*, unidad de masa atómica). La identidad de los compuestos se confirmó por comparación de los tiempos de retención y espectros de masas con los de los compuestos estándares (Fluka, Buchs, Suiza) y con la biblioteca NIST 2.0 (National Institute of Standards and Technology, 2005). La cuantificación de compuestos se realizó por comparación del área del pico con aquella del estándar interno *n*-hexadecano. El contenido de terpenos en cada muestra se normalizó por el área de hoja utilizada en la extracción. Los resultados se basaron en tres réplicas biológicas, cada una compuesta por cuatro plantas individuales.

### 2.2.9 Determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en el espacio aéreo de la planta (*head-space*)

La recolección de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) se realizó mediante el sistema detallado en la **Figura 2.3**, en el que se muestrearon en simultaneo y en paralelo 4 plantas de diferentes tratamientos. El muestreo se realizó durante 2 horas entre las 10:00 y las 13:00 horas en un ambiente climatizado a  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $50 \pm 10\%$  HR con iluminación artificial. Las macetas fueron cubiertas con papel de aluminio de manera que solo la parte aérea de la planta estuviera en contacto con el ambiente, y posteriormente se introdujeron muy suavemente dentro de jarras de 30 litros. El aire inyectado en las jarras durante el transcurso del experimento se filtró con carbón activado con el fin de eliminar cualquier tipo de contaminación. Antes de comenzar con el muestreo de los VOCs se dejó estabilizar el sistema por 30 minutos dejando correr el aire a la salida de las jarras. Finalizado el proceso de estabilización las corrientes de aire saliente de cada una de las jarras se conectaron a cuatro cartuchos de acero inoxidable rellenos con 200 mg de Tenax TA (Malla 20/35, CAMSCO, Houston, Texas, Estados Unidos), acoplados a una bomba de succión a un caudal de  $200\text{ ml min}^{-1}$ . Inmediatamente luego de la recolección de compuestos volátiles se determinó el peso fresco y el área de cada planta. Los cartuchos de Tenax TA fueron desconectados del dispositivo y secados con una corriente de  $\text{N}_2$  ( $50\text{ ml min}^{-1}$ ) durante 15 minutos para eliminar rastros de humedad. A continuación, los volátiles colectados fueron desorbidos térmicamente del cartucho a  $250^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos bajo una corriente de helio de  $20\text{ ml min}^{-1}$  en un equipo de desorción térmica Ultra 50:50 (Markes, Llantrisant, Glamorgan, Reino Unido) y recolectados simultáneamente en una trampa universal de solvente refrigerado a  $0^{\circ}\text{C}$  (Unity, Markes). Una vez finalizado el proceso de desorción, se procedió a la separación de los compuestos volátiles, para ello fueron liberados de la trampa por calentamiento balístico a  $40^{\circ}\text{C seg}^{-1}$  hasta los  $280^{\circ}\text{C}$ , y transferidos a una columna analítica (ZB-5MSi, 30 m (longitud), 0,25 mm (diámetro interno), 0,25  $\mu\text{m}$  (espesor del film) (*film thickness*) con 5 m de *built-in guard column*; Phenomenex, Torrance, California, Estados Unidos) situada en el horno del cromatógrafo gaseoso Thermo Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). El programa de temperatura para la correcta separación de los compuestos volátiles consistió en un calentamiento inicial a 40°C durante 2 minutos y posteriormente un incremento de 6°C min<sup>-1</sup> hasta una temperatura final de 280°C donde se mantuvo la temperatura constante durante 4 minutos bajo una corriente constante de helio de 1 ml min<sup>-1</sup>. La detección de compuestos volátiles se llevó a cabo en un espectrómetro de masas cuadrupolo Thermo Trace DSQ (Thermo Fisher Scientific) acoplado al cromatógrafo gaseoso. El espectrómetro se utilizó en modo de ionización por impacto electrónico a un potencial de 70 eV con un escaneo completo de masas en el rango de los 35 a 400 amu (atomic mass unit, unidad de masa atómica) a una tasa de 4,70 escaneos s<sup>-1</sup>. La línea de transferencia y la fuente de iones del espectrómetro se programaron a una temperatura de 275 y 250 °C respectivamente. La identificación de compuestos se realizó comparando los espectros de masas con aquellos presentes en las bases de datos NIST 2005 y Wageningen Mass Spectral Database of Natural Products, como así también por comparación de los índices de retención lineales (LRIs) obtenidos experimentalmente.



**Figura 2.3.** Dispositivo para la recolección de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). En la foto (a) se puede observar el equipo durante una sesión de recolección. En (b) se puede observar un esquema del equipo. El aire (1) provisto es se filtra y seca en un filtro de carbón activado (2) y posteriormente su flujo es medido y normalizado en el flujómetro principal (3). El aire luego se ramifica en cuatro ramas, cada una con su flujómetro individual (4), para abastecer las jarras (5) donde están contenidas las plantas. La salida de cada jarra está conectada a un cartucho colector de volátiles (6) acoplado a una válvula reguladora de caudal (7) que permite que el flujo de succión de la bomba de vacío (8) sea homogéneo en las cuatro ramas de salida.

### **2.2.10 Ensayo de herbivoría con *Mamestra brassicae***

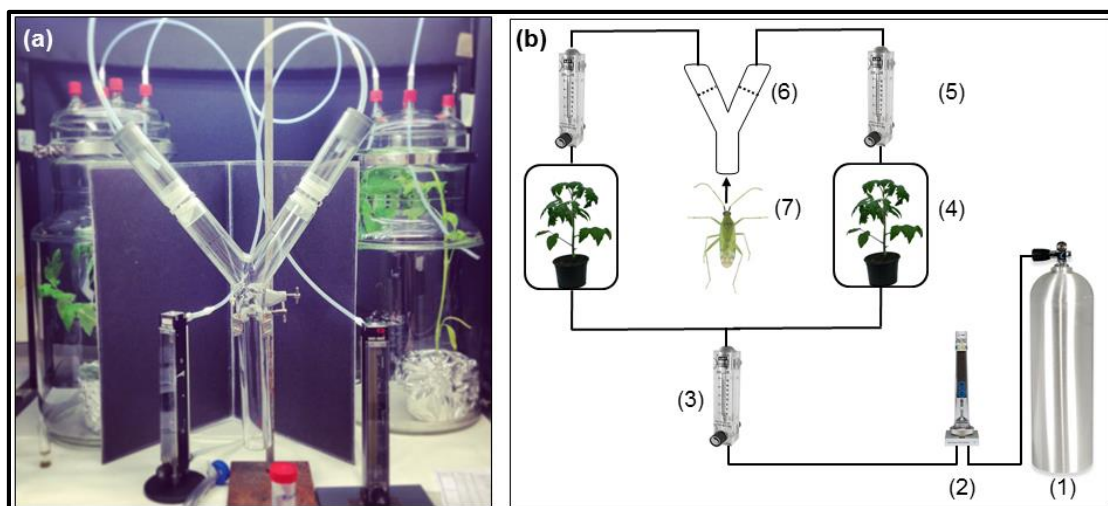
Para determinar la tasa de consumo que tiene un herbívoro sobre los genotipos de interés de la presente tesis, se utilizó al artrópodo *Mamestra brassicae*. En primer lugar se calculó el área foliar total de la planta de manera no destructiva, y posteriormente se colocó una larva de *M. brassicae* en estadio L5 sobre la tercer hoja de la planta. Seguidamente, se cubrió la hoja en particular y la planta con una tela de organza para evitar que la larva se caiga de la planta. Luego de 24 horas de alimentación se retiraron las larvas y se cuantificó el área foliar resultante. La tasa de herbivoría se calculó como el cociente de área foliar final sobre el inicial multiplicado por 100.

### **2.2.11 Ensayos de elección del predador *Macrolophus pygmaeus* en olfatómetro en "Y".**

Las respuestas del predador a las fuentes de compuestos volátiles emitidas por las plantas de tomate fueron observadas en un olfatómetro en Y de dos ramas. La metodología utilizada fue similar a la descrita por Lins *et al.* (2014) con algunas modificaciones menores. El olfatómetro consistió en un tubo de vidrio pyrex en forma de Y (3,5 cm de diámetro interno) con una entrada inferior de 26 cm de largo y dos ramas de 10 cm cada una a un ángulo de 70° con la horizontal. Durante el ensayo cada rama del olfatómetro se conectó a dos jarras de vidrio de 30 litros de volumen donde estaban contenidas las plantas. En cada jarra se colocó muy suavemente una única planta de cada tratamiento. Cada jarra se alimentó con aire comprimido previamente filtrado, como gas *carrier* a un caudal de 2,5 litros min<sup>-1</sup>. Como último paso antes de comenzar el ensayo de elección, se dejó estabilizar el sistema por 30 minutos para que las emisiones en cada rama del olfatómetro fueran homogéneas. Para este ensayo se utilizaron hembras de *M. pygmaeus*, las que fueron colocadas de a una por vez en la entrada inferior del olfatómetro a contra corriente del flujo de aire y se observó hasta que caminara no menos de 6 cm en dirección de alguna de las ramas. Cada hembra se utilizó una única vez y aquellas que no realizaron ninguna elección en los 10 minutos de prueba se excluyeron de los datos. Para

cada par de plantas se utilizaron 50 hembras en total, 10 hembras por día durante 5 días. Una vez testeadas 5 hembras, el olfato metro se giró 180° para alternar las dos ramas con las dos fuentes de compuestos volátiles y así evitar algún posible error de posición. Los ensayos se realizaron en un ambiente climatizado (el mismo donde se recolectaron los compuestos volátiles) a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 10\%$  HR con iluminación artificial. Entre el olfatómetro y las jarras de vidrio se colocó un panel negro para evitar cualquier tipo de pista visual que pudiera generar una atracción de las hembras hacia la planta. Tres pares de tratamientos fueron testeados como fuente de compuestos volátiles:

- 1) WT y *phyB1phyB2* control cultivadas bajo radiación natural.
- 2) WT y *phyB1phyB2* inducidas con MeJA cultivadas bajo radiación natural.
- 3) WT y WT RL inducidas con MeJA y cultivadas bajo radiación natural.



**Figura 2.4.** Esquema del Olfatómetro en "Y" utilizado en los ensayos de *choice*. En (a) se observa el equipo utilizado para el ensayo de elección del predador *Macrolophus pygmaeus*. En (b) se puede observar un esquema del equipo. El aire (1) provisto se filtra y seca en un filtro de carbón activado (2) y posteriormente su flujo es medido y normalizado en el flujómetro principal (3). El aire luego se ramifica en dos ramas y se homogeniza con los blends de compuestos volátiles de las plantas presentes en cada jarra (4). El caudal de los blends de cada jarra se ajusta con dos flujómetros individuales (5) previo a llegar a cada rama del olfatómetro (6). El insecto se coloca en la base de la Y de vidrio y se libera para que haga su elección sobre la base de los blends ofrecidos (7).

## 2.2.12 Análisis estadísticos

En los análisis de expresión génica y determinación de metabolitos secundarios (compuestos fenólicos y terpenos en hoja) los datos fueron analizados mediante el test estadístico ANOVA de dos factores, el genotipo y la inducción con MeJA. Los datos de la determinación del peso específico foliar se analizaron mediante el test estadístico de ANOVA de un factor, siendo este el genotipo. La diferencia entre medias se evaluó mediante el test de comparación a posteriori de Tukey. En los bioensayos con *M. brassicae* y en la cuantificación de tricomas los datos fueron analizados mediante el test estadístico de Student (*t*-test). Los análisis estadísticos mencionados anteriormente se realizaron con el software INFOSTAT versión 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011). La respuesta de elección de predador *Macrolophus pygmaeus* fue analizada con el software SPSS v.21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos) mediante modelos lineales generalizados (GLMs) con una distribución binomial y una función logit-link. La variable respuesta fue la proporción de insectos que respondían a una de las fuentes de volátiles. Para todos los experimentos se realizó un GLM binomial para estimar si la respuesta del predador era significativamente diferente de una distribución del 50%. La significancia de la respuesta del predador se analizó mediante el test estadístico de Chi Cuadrado de Wald. Los datos de emisión de VOCs, expresados como el área del pico dividido por el peso fresco de la planta, fueron analizados mediante los test de Shapiro-Wilks y Bartlett para corroborar si cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad respectivamente, necesarios para poder aplicar un estadístico de ANOVA paramétrico. Dado que los datos no obedecieron a una distribución normal y homogeneidad en las varianzas, para poder comparar las medias entre los distintos tratamientos se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con el software estadístico R (R CoreTeam, 2014). El análisis de los datos de emisión de los distintos VOCs también se realizó entre pares de tratamientos para lo cual se utilizó el test estadístico de Mann-Whitney U con el software INFOSTAT. Los datos de emisión de compuestos volátiles se transformaron con la función log y se sometieron a un análisis multivariado usando el método del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y su extensión análisis discriminante ortogonal de mínimos cuadrados parciales (OPLS-DA) con el

software SIMCA-P + 12.0 (Umetrics AB, Umea, Suecia), según lo descrito previamente por Weldegergis *et al.* (2015). Estos métodos de análisis permitieron separar a los distintos grupos de plantas en base a las diferencias cuali y cuantitativas del blend de volátiles que emitieron. Los resultados de los análisis se visualizaron en *score plots*, donde se vio el patrón de distribución de las diferentes réplicas de cada grupo de plantas, de acuerdo a los componentes del modelo, y *loading plots*, donde se vio la contribución de cada variable (cada compuesto volátil individual) a cada componente del modelo, así como también la relación entre variables en base a la importancia que cada una tiene en el análisis (Valor VIP, *Variable Importance in Projection*). Estos valores VIPs son arrojados por el modelo cuando se comparan distintos grupos de muestras y determinan cuán importante es una variable, en este caso un determinado compuesto volátil, en la diferenciación de cada grupo de muestras en el análisis (Wold *et al.*, 2001). Cuanto mayor es el valor VIP, mayor es la contribución de ese compuesto en la separación y diferenciación de las muestras. Los compuestos volátiles que se analizaron fueron aquellos que estuvieron presentes en más de la mitad de las muestras de todos los tratamientos.





## **Capítulo 3**

**El efecto del fitocromo B (phyB) sobre las defensas directas, estructurales y químicas, y su inducción ante el ataque de un herbívoro.**

## Capítulo 3

### **El efecto del fitocromo B (phyB) sobre las defensas directas, estructurales y químicas, y su inducción ante el ataque de un herbívoro.**

#### **3.1. Introducción**

En su hábitat natural las plantas están expuestas a numerosas amenazas que abarcan el ataque de herbívoros y patógenos, estreses abióticos y competencia intra- e interespecífica con plantas vecinas. Teniendo en cuenta esta situación sumado a la incapacidad de trasladarse a ambientes más favorables, podríamos pensar que el hecho de poder completar su ciclo de vida y dejar descendencia se convierte en una tarea muy compleja. Afortunadamente, a pesar de las circunstancias adversas las plantas logran alcanzar su objetivo, con una serie de herramientas que evolutivamente han adquirido y desarrollado (Strauss y Agrawal, 1999; Agrawal, 2004; Jackson *et al.*, 2009). De esta manera las plantas tienen la capacidad de detectar el factor de stress, ajustar su morfo- y fisiología, lo que les permitirá aclimatarse a las condiciones del ambiente y continuar con su ciclo de vida (Levitt, 1980).

La presencia de plantas vecinas y de insectos herbívoros presupone un desafío doble para la planta, crecer para evitar ser sombreada y por otro lado defenderse de un posible ataque. Hasta el momento existe poca información acerca de cómo las plantas enfrentan el dilema de “crecer o defenderse”. Estudios recientes han demostrado que al enfrentarse a situaciones de competencia y de ataque de patógenos en forma simultánea se activa la expresión del sistema SAS y no el de defensas (de Wit *et al.*, 2013). La inactivación del phyB participa en esta regulación negativa en la respuesta de los JAs, produciendo que la planta sea más susceptible al ataque de patógenos e insectos (Moreno *et al.*, 2009; Cerrudo *et al.*, 2012; Kegge *et al.*, 2013; Izaguirre *et al.*, 2013; de Wit *et al.*, 2013; Leone *et al.*, 2014; Chico *et al.*, 2014; Cerrudo *et al.*, 2017).

La esclerofilia y la pubescencia son características físicas clave en la protección de las plantas frente al ataque de herbívoros. La esclerofilia, término

acuñado por Schumper en 1903 está asociado a la dureza del tejido foliar y tiene fuerte acción como agente disuasivo frente a la amenaza de un herbívoro. Teniendo en cuenta la dificultad para medir el espesor del tejido foliar, la relación entre su masa y área (Leaf Mass per Area, LMA), es una buena aproximación para estimar su esclerofilia (Poorter *et al.*, 2009; Muir *et al.*, 2014). Los tejidos escleromórficos tienen una reducida palatabilidad y digestibilidad en el tracto digestivo del herbívoro (Grubb, 1986; Robbins, 1993). A pesar de que los tejidos escleromórficos *per se* no pueden evitar el ataque, sus consecuencias sobre el herbívoro obligarán a este a explorar otras opciones más palatables presentes en el entorno (Forsyth *et al.*, 2005). La morfología foliar y sus características (espesor, dureza, anfiestomia, etc.) poseen plasticidad y son susceptibles a las condiciones reinantes de humedad, temperatura y luz (Coneva *et al.*, 2017). Pieruschka y Poorter (2012) han observado que el espesor de la hoja se ve directamente afectado por la cantidad y calidad de luz incidente sobre el mismo. Teniendo en cuenta que los fitocromos son fotorreceptores que perciben la cantidad y calidad de luz es de esperar que su inactivación genere cambios en los caracteres morfológicos de la hoja con posibles consecuencias sobre niveles tróficos superiores.

La pubescencia es el termino colectivo utilizado para denominar al conjunto de pelos (tricomas) presentes en tallos, hojas y frutos. Los tricomas comunmente se clasifican en glandulares y no glandulares, y pueden variar en tamaño, forma, número de células, morfología y composición química (Goffreda *et al.*, 1989; Nonomura *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010a; Kang *et al.*, 2010b; Schillmiller *et al.*, 2010). Numerosos estudios han mostrado que los tricomas poseen diferentes funciones incluyendo las defensas contra herbívoros, por el simple hecho de impedir la locomoción y/u oviposición o bien por su efecto tóxico a través de la producción y liberación de compuestos químicos (Kennedy, 2003; Arimura *et al.*, 2005; Peiffer *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010a; Kang *et al.*, 2010b). Cuanto más alta es la densidad de tricomas en hoja, menor es la posibilidad que un herbívoro se alimente o bien deposite sus huevos sobre su superficie (Handley *et al.*, 2005). Existe evidencia que muestra que en plantas que han sido atacadas por herbívoros la densidad de tricomas es mayor en las hojas nuevas (Holeski, 2007). En tomate, la aplicación de MeJA produce un incremento de tricomas glandulares en las hojas nuevas (Boughton *et al.* 2005). El daño

ocasionado por un herbívoro o la inducción con MeJA no solo afecta la cantidad de tricomas sino también altera la composición química de la mezcla almacenada (Peiffer *et al.*, 2009). En tomate los tricomas están clasificados por tipos de I a VII. Los tipo I, IV, VI y VII son glandulares, y los tipo II, III y V son no glandulares. La mayor distinción entre no glandular y glandular es que estos últimos poseen en su extremo apical un reservorio de compuestos químicos, que al ser liberados, pueden repeler o intoxicar al insecto (Schilmiller *et al.*, 2010). Los no glandulares no poseen reservorios y funcionan como barrera física. La característica más importante de los tricomas glandulares de tomate es la capacidad de producir y secretar una amplia variedad de metabolitos secundarios como terpenoides (Schilmiller *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2010b; Kang *et al.*, 2010a) y compuestos fenólicos (Gang *et al.*, 2001) entre otros. La alteración de la densidad de tricomas tiene importancia desde el punto de vista ecológico ya que puede modular negativamente las poblaciones de herbívoros (Agrawal, 1999). Existe evidencia que tanto la intensidad de luz y el fotoperiodo afectan directamente el desarrollo de tricomas (Chien y Sussex, 1996), así como también JA, las giberelinas, el ácido salicílico y los brasinoesteroides entre otros y diferentes fitohormonas (Traw y Bergelson, 2003; Boughton *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2009; Escobar-Bravo *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta que la calidad de luz percibida por los fitocromos puede alterar el balance hormonal de la planta y también tiene un rol importante en la sensibilidad de los jasmonatos, podríamos pensar que la inactivación del fitocromo podría afectar el desarrollo de tricomas.

Las defensas físicas sirven como una contención primaria frente al ataque de un herbívoro. Cuando estas ceden y se establece el ataque, existe una segunda barrera compuesta de metabolitos secundarios que son producidos constitutivamente por la planta y ayudan a frenar el ataque. Existe evidencia que los compuestos fenólicos solubles, como los flavonoides, presentes en tomate poseen un rol importante en la defensa anti-herbívoro (Elliger *et al.*, 1981; Stamp y Yang, 1996). Inmediatamente después de que se ha producido el ataque del herbívoro, la percepción de señales de stress ocasionado por el daño induce la activación de la biosíntesis del JA. El JA juega un rol central en la regulación de un amplio rango de respuestas anti-herbívoros (Howe y Jander, 2008) como así también en otros procesos del desarrollo de la planta. La síntesis de terpenos en tricomas glandulares se ve inducida post-tratamiento con MeJA (Escobar-Bravo

*et al.*, 2017). Ensayos realizados con microarrays de ADN han mostrado que la aplicación exógena de MeJA o la generación de JA endógeno por daño mecánico o herbivoría activan la expresión de genes de rutas biosintéticas de metabolitos secundarios y también de proteínas de defensas tales como, inhibidores de proteasas, polifenol oxidasas, etc. (Li *et al.*, 2004; Schaller, 2008; Escobar-Bravo *et al.*, 2017). Investigaciones recientes han mostrado que las bajas R:RL regulan negativamente las defensas en plantas intolerantes a la sombra (Ballare, 2014). La baja en los sistemas de defensa se pueden explicar por una atenuación en la vía de los jasmonatos producida por las bajas R:RL percibida por el phyB (Ballare, 2014). Observaciones recientes en nuestro grupo de trabajo y otros laboratorios han demostrado que las plantas crecidas bajo un régimen de sombreado, cuando son atacadas, acumulan bajos niveles de JA (Agrawal *et al.*, 2012), consistentemente la inactivación del phyB reduce la sensibilidad de la planta al MeJA exógeno (Ballare y Pierik, 2017).

El objetivo de este capítulo es determinar el efecto de la inactivación del phyB sobre la modulación e inducción de las defensas directas en *Solanum lycopersicum* cultivado bajo radiación natural. Evaluamos los parámetros clásicos asociados al SAS, simulando la presencia de plantas vecinas desde un *approach* (aproximación) genético y manipulando el entorno lumínico. Estudiamos los sistemas de defensas físicas como tricomas y esclerofilia, y químicas constitutivas e inducibles.

## **3.2. Resultados**

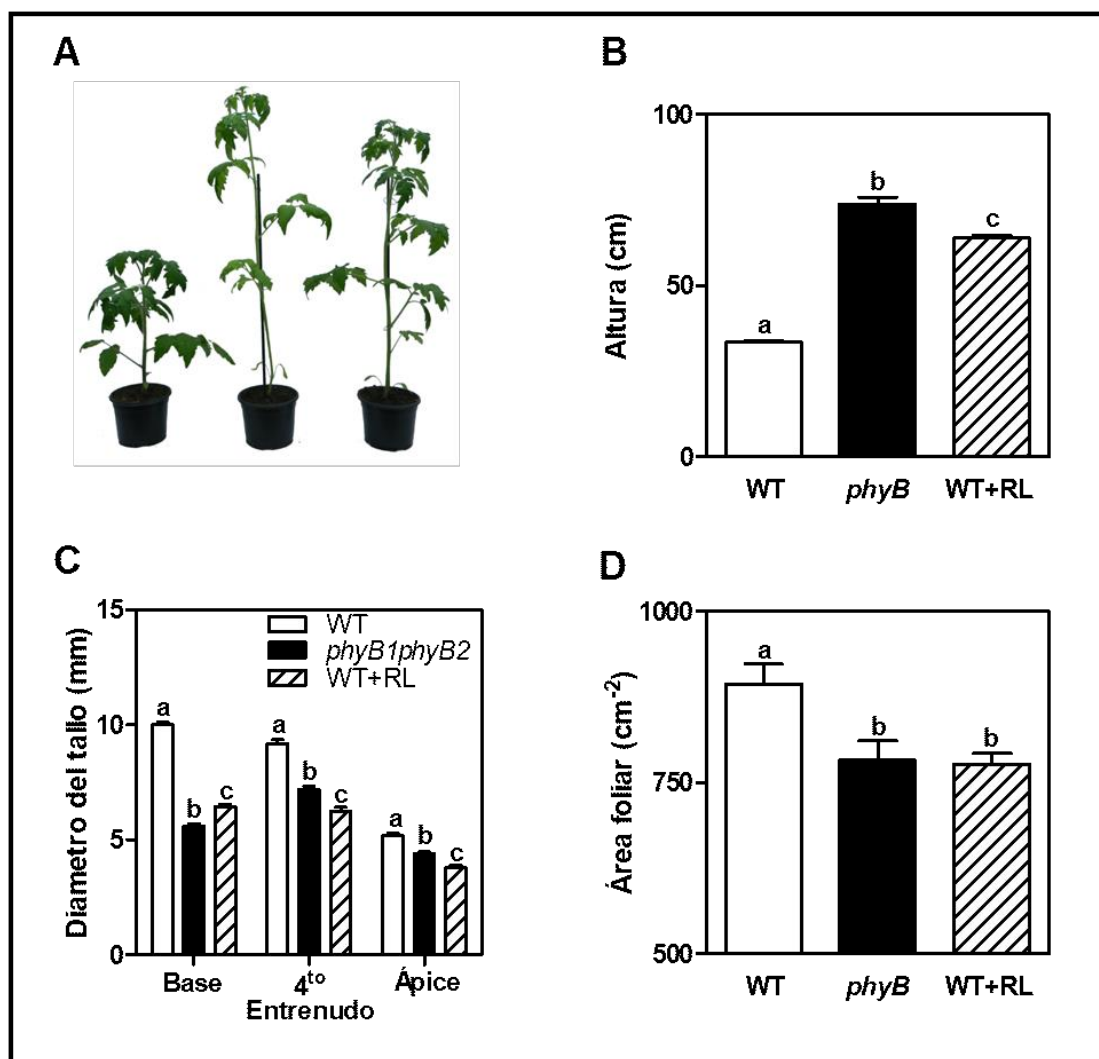
### **3.2.1. Las bajas R:RL desencadenan el SAS y atenúan los niveles de defensas constitutivas.**

Cuando las plantas crecen rodeadas de vecinas desencadenan una serie de cambios morfo-fisiológicos denominado síndrome de escape al sombreado (SAS). Este fenómeno se manifiesta a través de cambios que le permiten a la planta acceder a claros de luz, economizar el uso de agua y anticipar su descendencia en un escenario de competencia intra-específica (Boccalandro *et al.*, 2009; Casal, 2012b). Para esta serie de experimentos se utilizaron dos

aproximaciones complementarias con fin de inactivar el phyB. El primero constó de la utilización de líneas que tenían mutaciones en los dos genes *PHYB* presentes en el genoma de tomate (*phyB1phyB2*) (Weller *et al.*, 2000), y el segundo consistió en la aplicación de radiación RL para imitar el efecto de sombreado ocasionado por plantas vecinas (Ballare, 2009). El tratamiento de RL se realizó suplementando la radiación natural incidente con radiación RL aplicada lateralmente, sin alterar los niveles de luz PAR pero sí la relación R:RL simulando la presencia de plantas vecinas (WT+RL) (Izaguirre *et al* 2006). Las plantas fueron cultivadas durante 28 días y posteriormente se evaluaron distintos parámetros morfológicos característicos del SAS.

Como resultado se observó que ambas aproximaciones tuvieron un marcado fenotipo característico del SAS. Como era de esperarse, la inactivación del phyB produjo plantas con un diámetro de tallo menor que el control WT. Esta medición se realizó a tres alturas de la planta, base, cuarto entrenudo y ápice, y en todos los casos el tallo fue más fino en ambos tratamientos donde las plantas tenían phyB inactivo comparado con el WT. La inactivación del phyB produjo una menor área foliar y una mayor altura en comparación con las plantas que tenían el phyB intacto (**Figura 3.1**).

Una vez alcanzadas las cuatro semanas de crecimiento, se tomaron muestras de los genotipos WT y *phyB1phyB2* para su análisis de contenido de compuestos fenólicos solubles. Los niveles de flavonoides (compuestos C<sub>15</sub>), como el kaempferol y la rutina fueron mayores en el WT. En contraste, los niveles de compuestos fenólicos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, pertenecientes a la familia de los fenilpropanoides, como el ácido clorogénico y ferúlico, fueron suavemente más altos en el mutante (**Tabla 3.1**). De estos resultados se podría presumir que la inactivación del phyB tendría un efecto negativo sobre la vía de los flavonoides y generaría un re direccionamiento hacia la síntesis de fenilpropanoides.



**Figura 3.1.** Efecto de la inactivación del *phyB* sobre parámetros morfológicos de la planta. La inactivación del fitocromo B (*phyB*) por el tratamiento con radiación rojo lejano (RL) o mutación de los genes *PHYB* produce de manera constitutiva la activación del síndrome de escape al sombreado (SAS). Fenotipo característico de plantas WT, doble mutantes de *phyB* (*phyB1phyB2*), e irradiadas con radiación RL lateral (**A**). A los 28 días post germinación se midió altura (**B**), diámetro de tallo (**C**) y área foliar (**D**). La barra de error representa el error estándar (n=10 réplicas). La barra de referencia en (**A**) corresponde a 20 cm.

Compuesto	Clase	WT	<i>phyB1phyB2</i>	<i>P</i> -valor
Ácido Ferúlico	C6-C3	1,62±0,09	1,98±0,06	<b>0,019</b>
Ácido Clorogénico 1	C6-C3	2,84±0,13	3,53±0,12	<b>0,007</b>
Ácido Clorogénico 2	C6-C3	10,75±0,76	14,44±0,65	<b>0,010</b>
Rutina	C15	2,42±0,35	0,89±0,26	<b>0,013</b>
Glucósido de Rutina	C15	0,31±0,07	0,21±0,03	0,204
Kaempferol	C15	0,60±0,12	0,15±0,05	<b>0,014</b>

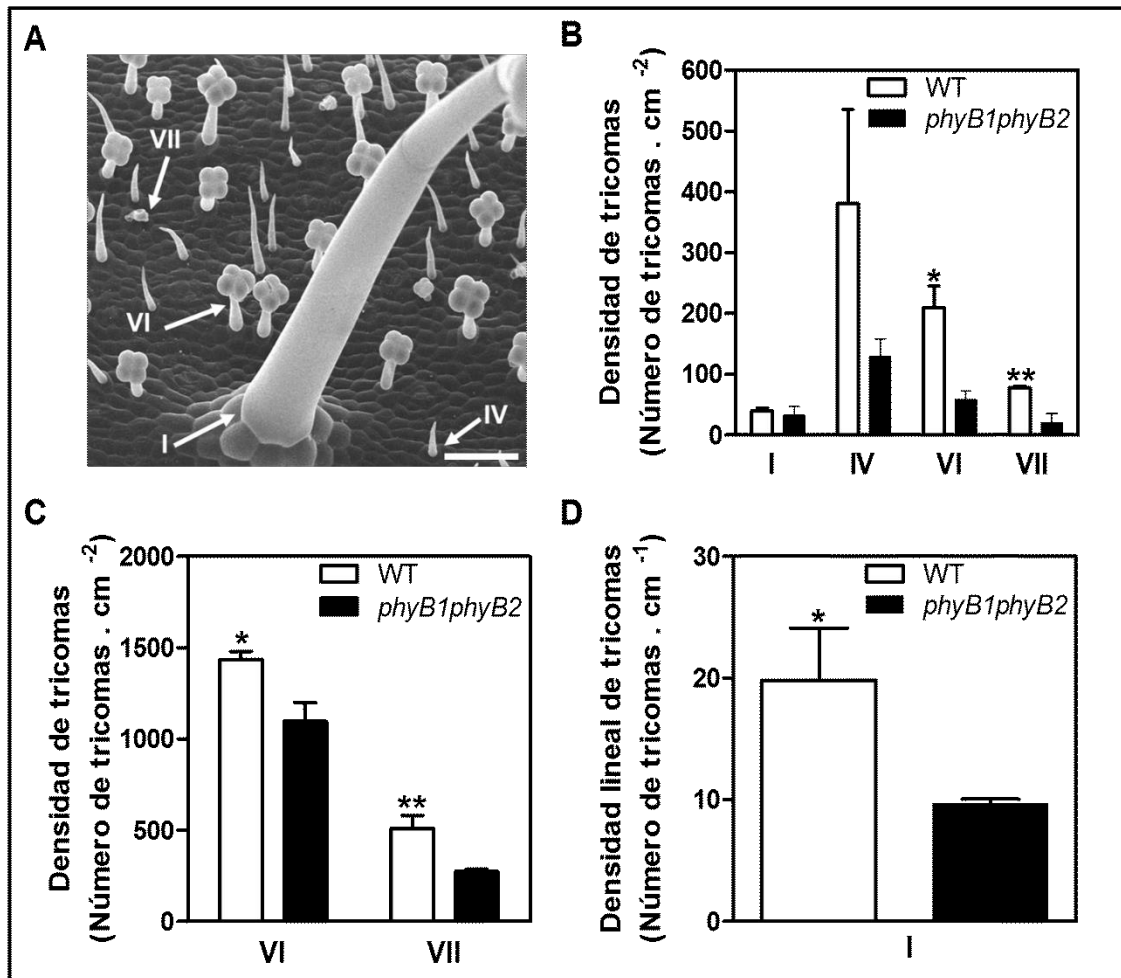
**Tabla 3.1.** Contenido de compuestos fenólicos solubles en plantas WT y *phyB1phyB2*. Los valores están expresados como  $\mu$ moles por gramo de tejido seco  $\pm$  SE. Los compuestos con diferencias significativas muestran un *P*-valor<0,05. (n=4 réplicas).

### 3.2.2.La inactivación del phyB modula el desarrollo de tricomas y afecta el espesor del tejido foliar.

*Solanum lycopersicum* produce una abundante cantidad y una diversa morfología de tricomas en hojas y tallos. Esta característica, sumada a las anteriormente descritas en la introducción general, hace que el tomate sea un buen modelo de estudio de tricomas. En esta serie de experimentos hemos cuantificado la densidad de tricomas en tallo y hoja, y por otra parte la masa seca de hoja por unidad de área (Leaf Mass per Area, LMA) la cual esta descrita como una buena aproximación para estimar la dureza de la hoja (Poorter et al., 2009).

A través de la microscopia electrónica de barrido (SEM) se identificaron y cuantificaron cuatro tipos de tricomas presentes en el cultivar *MoneyMaker*, tipo I, IV, VI y VII (**Figura 3.2 A**). Se observó que el mutante *phyB1phyB2* tiene menor densidad de tricomas tipo VI y VII, en tallo y hoja que el genotipo WT (Figura 3.2 B y C). Los tricomas tipo I se encuentran en baja densidad lo que no genera una confianza estadística suficiente para poder estimar diferencias entre los genotipos para tricomas en tallo y hoja). Con el fin de estimar la cantidad de tricomas tipo I se realizaron mediciones de densidad lineal (número de tricomas por centímetro). Se observó que el mutante *phyB1phyB2* tiene una menor densidad lineal que el genotipo WT.





**Figura 3.2.** Variedades de tricomas presentes en *Solanum lycopersicum* cv. *Moneymaker* y el efecto de la inactivación del fitocromo B (*phyB*) en la densidad de tricomas. (A) Fotografías de tomadas por la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la cara adaxial de una hoja *wild-type* (WT). Los tipos de tricomas I, IV, VI y VII se indican con flechas blancas. La barra de referencia corresponde a 200  $\mu\text{m}$ . (B) y (C) Densidad de tricomas en hoja (tipo I, IV, VI, VII) y tallo (tipo VI y VII), respectivamente, cuantificados en plantas de 4 semanas WT y *phyB1phyB2*. Las barras de error representan el error estándar ( $n=3$  réplicas). (D) Densidad lineal de tricomas tipo I en plantas WT y *phyB1phyB2*. Las barras de error representan el error estándar ( $n=10$  réplicas). Los asteriscos indican diferencias significativas entre WT y *phyB1phyB2* (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

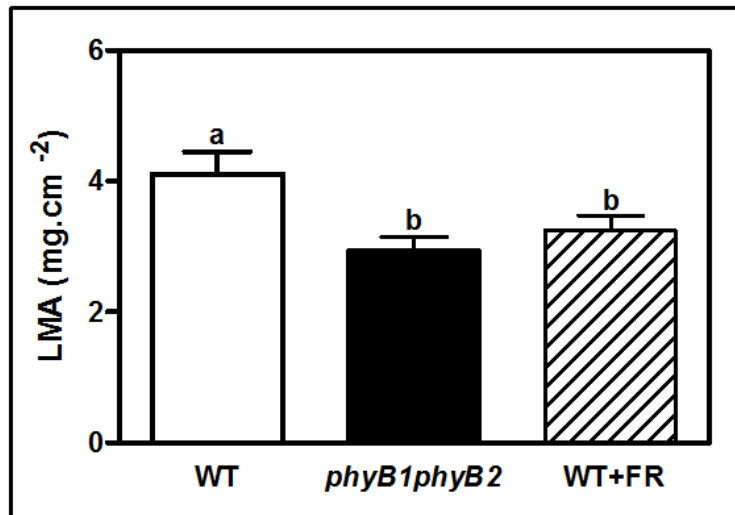
Posteriormente a través de la realización de improntas de hoja se estimó la densidad total de tricomas (número de tricomas/cm<sup>2</sup>) y el índice de tricomas (relación entre el número total de tricomas y número de células totales presentes en la epidermis). Estas mediciones arrojaron una menor densidad de tricomas

totales en *phyB1phyB2*, en concordancia con los resultados anteriormente descritos, a su vez el índice de tricomas no presento diferencias significativas entre los genotipos. De aquí podemos afirmar que la menor densidad de tricomas en el genotipo *phyB1phyB2* es producto de una reducción en el número de células epidérmicas por unidad de área (**Tabla 3.2**)

Parámetro	Unidades	Cara	n	WT	<i>phyB1phyB2</i>	<i>p</i> -valor
TI		AB	8	0,33±0,02	0,34±0,02	<b>0,66</b>
		AD	8	0,23±0,02	0,22±0,07	<b>0,72</b>
TD	<i>Tricomas. cm<sup>-2</sup></i>	AB	8	3738,71±318,72	2630,71±208,06	<b>0,01</b>
		AD	8	2078,43±263,79	1282,73±165,11	<b>0,03</b>
CD	<i>Células.mm<sup>-2</sup></i>	AB	20	1054,01±35,81	763,59±25,86	<b>&lt;0,0001</b>
		AD	20	967,21±32,65	707,53±30,79	<b>&lt;0,0001</b>

**Tabla 3.2.** Valores de índice de tricomas (TI), densidad de tricomas (TD) y densidad de células epidérmicas (CD) en la cara abaxial y adaxial de plantas WT y *phyB1phyB2*. Los compuestos con diferencias significativas muestran un *p*-valor<0,05.

Como se mencionó anteriormente, el valor de masa foliar por área (LMA) es un rasgo morfológico asociado con la compensación entre la adquisición de recursos y la longevidad de la hoja (Sastry y Barua, 2017). A su vez, es una buena aproximación para estimar cuán dura y gruesa puede ser una hoja, atributos que correlacionan con la dificultad que enfrentan los herbívoros que quieren alimentarse de ella (Caldwell *et al.*, 2016). A partir de discos de tejido foliar fresco que fueron posteriormente secados en estufa se estimó la masa foliar por unidad de área de las plantas WT, *phyB1phyB2* y WT+RL. Se observó que las plantas *phyB1phyB2* y WT+RL tienen menor LMA que las WT. Estos resultados muestran que la inactivación del *phyB* tiene un efecto sobre la dureza de las hojas. (**Figura 3.3**).

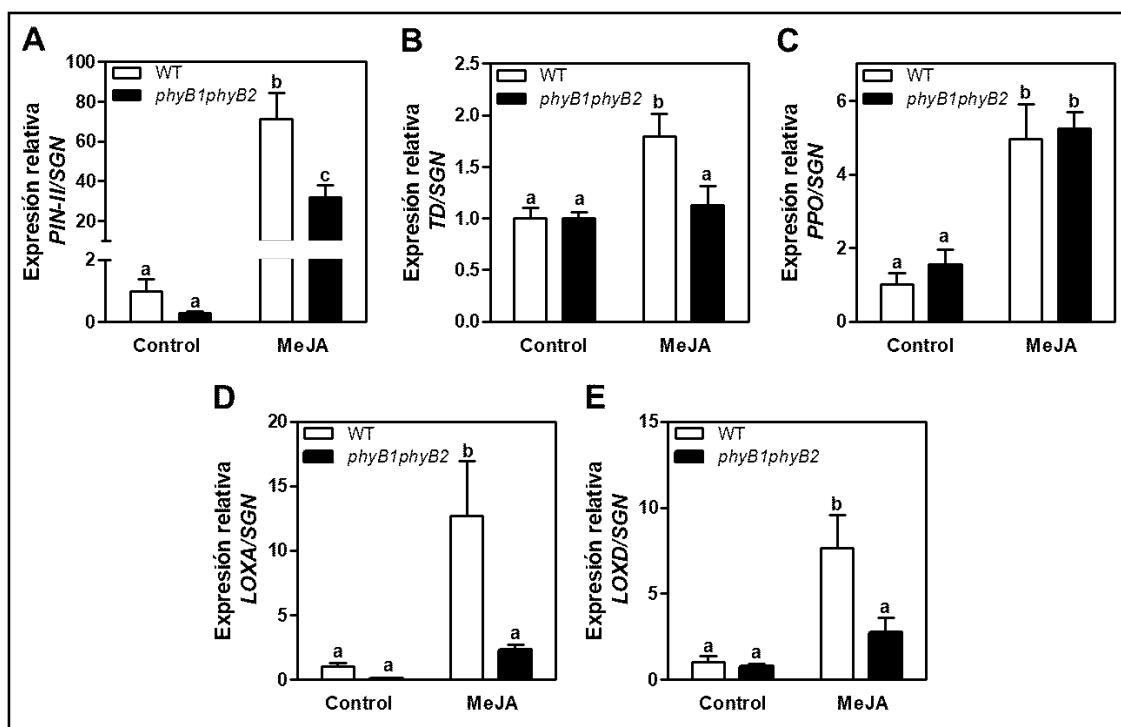


**Figura 3.3.** Masa foliar por unidad de área (LMA). La inactivación del phyB produce en plantas *phyB1phyB2* y WT+RL una menor LMA que en plantas WT. Una menor masa por unidad de área produce hojas más finas y blandas. Las barras de error representan al error estándar (n=8 réplicas). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos y o genotipos ( $p=0,013$ ).

### 3.2.3. Las bajas relaciones R:RL reprimen la inducción de defensas mediadas por el JA.

La inactivación del phyB, ya sea por bajas R:RL o mutaciones del gen, produce la atenuación en la vía de señalización del JA. El efecto de sombreado como represor de la respuesta del JA fue demostrado originalmente en *Arabidopsis* en experimentos donde se simuló la presencia de plantas vecinas, disminuyendo la R:RL y se observó una reducción de la sensibilidad al MeJA aplicado exógenamente (Moreno *et al.*, 2009). En estos ensayos estudiamos la respuesta de las defensas directas inducibles al MeJA exógeno en plantas WT y *phyB1phyB2* cultivadas bajo radiación natural. Particularmente se estudió la producción de terpenos contenidos en hoja y la expresión de genes codificantes para proteínas de defensa y de la vía de producción de JA. La inactivación del phyB en tomate funciona como un regulador negativo de la actividad del MeJA exógeno sobre la expresión de genes involucrados en los sistemas de defensa inducidos por JA como lo son la *TREONINA DEAMINASA (TD)* y el *INHIBIDOR*

DE PROTEINASA (*PIN-II*). Un patrón similar se observó sobre el gen marcador *LIPOXIGENASA A* (*LOXA*), y *LIPOXIGENASA D* (*LOXD*) involucrado en la biosíntesis del JA. Por su parte la expresión del gen de la POLIFENOL OXIDASA (*PPO*) no se vio afectado por la inactivación del phyB (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4.** Efecto de la inactivación del fitocromo B (*phyB*) sobre la expresión de genes en respuesta a MeJA. La expresión de los genes fue medida luego de 8h de rociar las plantas WT y *phyB1phyB2* de *Solanum lycopersicum* de 4 semanas, con una solución de MeJA (100 $\mu$ M) (**MeJA**). Los niveles de expresión fueron relativizados al control tratado con agua y bajo radiación natural (**Control**) y al gen de expresión constitutiva *SGN* (*SGN-U346908*). La barra de error, representa al error estándar (n=3 réplicas). En cada panel, las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos ( $p < 0.05$ ). **A)** INHIBIDOR DE PROTEINASA (*PIN-II*); **B)** TREONINA DEAMINASA (*TD*); **C)** POLIFENOL OXIDASA (*PPO*); **D)** LIPOXIGENASA A (*LOXA*) y **E)** LIPOXIGENASA D (*LOXD*).

En pos de estudiar el efecto de la inactivación del *phyB* sobre la producción de terpenos en respuesta al MeJA, se realizó un extracto de hoja de los genotipos WT y *phyB1phyB2* donde se identificaron y cuantificaron los terpenos presentes. A las 24 horas posteriores se observó que los compuestos  $\beta$ -felandreno y terpinoleno aumentaron su concentración en las plantas WT en respuesta al MeJA; mientras que en las plantas *phyB1phyB2*, el efecto inductor

del MeJA se vio reflejado en un aumento de los niveles de  $\alpha$ -pineno y *E*- $\beta$ -cariofileno (**Tabla 3.3**).

Compuesto	Clase	WT		<i>phyB1phyB2</i>		<i>p</i> -valor
		Control	MeJA	Control	MeJA	
$\alpha$ -Pineno	Monoterpeno	6,772 $\pm$ 0,39a	23,18 $\pm$ 4,18a	5,68 $\pm$ 1,10a	52,07 $\pm$ 7,53b	0,002
Terpinoleno	Monoterpeno	69,74 $\pm$ 9,66a	180,10 $\pm$ 36,39b	48,19 $\pm$ 10,67a	18,10 $\pm$ 2,03a	0,003
2-Careno	Monoterpeno	30,40 $\pm$ 2,27a	30,41 $\pm$ 2,14a	13,49 $\pm$ 2,56b	25,65 $\pm$ 6,04ab	0,065
<i>E</i> - $\beta$ -Cariofileno	Sesquiterpeno	37,57 $\pm$ 4,15a	68,66 $\pm$ 9,25b	18,16 $\pm$ 1,76a	148,34 $\pm$ 14,11c	<0,001
$\beta$ -Felandreno	Sesquiterpeno	40,21 $\pm$ 6,29a	417,3 $\pm$ 025,9b	20,20 $\pm$ 3,97a	126,7 $\pm$ 7,08c	<0,001

**Tabla 3.3.** Efecto de la inactivación del fitocromo B (*phyB*) sobre la producción de terpenos en hoja en respuesta a MeJA. La concentración de compuestos terpénicos fue cuantificada luego de 24 h de rociar las plantas WT y *phyB1phyB2* de *Solanum lycopersicum* de 4 semanas, con una solución de MeJA (450  $\mu$ M) (**MeJA**) o agua (**Control**) crecidas bajo radiación natural. Los datos se expresan como ng. cm<sup>-2</sup> de tejido foliar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos basado en el análisis de las varianzas (ANOVA).

### 3.3.Discusión

Las plantas que crecen en alta densidad, tanto en ambientes naturales como en agrícolas, tienen un alto riesgo de ser sombreadas por la vegetación que las rodea. Durante la evolución se han desarrollado una variedad de respuestas plásticas que les permiten sobrevivir a condiciones adversas. Uno de estos mecanismos es la detección de plantas vecinas percibiendo cambios en el espectro lumínico a través de los fitocromos (*phys*), que desencadena cambios morfológicos que evitan el sombreado. Al mismo tiempo, las plantas se encuentran expuestas a un gran número de herbívoros que tratan de alimentarse de ellas. Es así que en la naturaleza las plantas se enfrentan a múltiples factores de estrés en forma simultánea, lo que presumiblemente ha actuado como fuerza selectiva para que se generaran mecanismos moleculares de comunicación entre las cadenas de señalización que se activan en respuesta a diferentes tipos de estrés. En este contexto, nuestro entendimiento de los mecanismos que permiten

a las plantas tomar decisiones adaptativas en situaciones donde enfrentan al mismo tiempo presiones de herbivoría y competencia es aún bastante limitado.

### **3.3.1. La producción de compuestos fenólicos está modulada por el phyB.**

Además del efecto sobre las defensas físicas constitutivas, se demostró que la inactivación del phyB modula negativamente la producción de compuestos fenólicos C15 (**Tabla 3.1**). Este efecto negativo sobre los niveles de flavonoides ha sido descrito en varias especies (Mazza y Ballare, 2015; Holopainen *et al.*, 2018), sin embargo en tomate el efecto de la radiación RL sobre la producción de flavonoides puede variar entre los distintos órganos de la planta (Cagnola *et al.*, 2012). Si bien los mecanismos moleculares que conectan la biosíntesis de flavonoides con la actividad del phyB no están del todo esclarecidos, existe fuerte evidencia de que varios pasos en la biosíntesis de fenilpropanoides están regulados por la luz y los fitocromos (Mancinelli *et al.*, 1991; Beggs y Wellmann, 1994). Es importante destacar que los compuestos fenólicos solubles han sido descritos como parte del arsenal de defensa anti-herbívoro en muchas especies (Appel, 1993), inclusive en tomate (Elliger *et al.*, 1981; Stamp y Yang, 1996).

### **3.3.2. La inactivación del phyB producto de bajas R:RL modula negativamente las defensas físicas en plantas intolerantes a la sombra.**

Las plantas de tomate poseen sus hojas, pecíolos y tallos cubiertos de tricomas, lo cual junto con la dureza de la hoja le confiere a la planta una protección innata frente a un amplio rango de insectos herbívoros. La densidad, morfología y composición química de los tricomas son rasgos importantes de este mecanismo de defensa para prevenir o contener el daño generado por el insecto. Teniendo en cuenta la importancia agronómica del cultivo de tomate alrededor del mundo, la resistencia adquirida a través de la presencia de tricomas permite reducir la utilización de pesticidas y generar prácticas agronómicas sustentables con el medio ambiente (Simmons y Gurr, 2004; Alba *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010b).

La inactivación del phyB en el doble mutante *phyB1phyB2* tiene un claro efecto negativo sobre la densidad de tricomas como consecuencia de un aumento en el tamaño de las células epidérmicas (**Figura 3.2; Tabla 3.2**). Si bien existe evidencia del efecto que posee la luz sobre la diferenciación de tricomas (Yamaura *et al.*, 1989; Chien y Sussex, 1996) podríamos esperar que fuera un efecto directo de la luz mediado por el phyB quien actuara sobre la diferenciación de tricomas. Sin embargo hemos observado que la menor TD se debe a un efecto de dilución debido al aumento de tamaño de las células epidérmicas. Estas observaciones se apoyan en que el TI (índice de tricomas, número de tricomas sobre el número total de células) no se vio afectado por la variable genotipo, lo cual nos da la certeza de que el efecto de menor TD no es por cambios en el patrón de diferenciación. Estos resultados son consistentes con los observados en otras especies donde se muestra que la inactivación del phyB modula la diferenciación y el tamaño de las células epidérmicas (Boccalandro *et al.*, 2009; Casson y Hetherington, 2014).

Si bien *per se* la dureza de los tejidos aéreos no es un factor determinante en el control de la herbivoría, existe evidencia que, en varias especies, los herbívoros tienden a evitar alimentarse de las hojas más duras (Choong, 1996; Pennings *et al.*, 1998). Sin embargo, el modo de alimentación de todos los herbívoros no es el mismo, y es por eso que la dureza de la hoja no es una estrategia determinante contra minadores o succionadores (Caldwell *et al.*, 2016). En este trabajo demostramos que la dureza de las hojas se ve afectada negativamente por la inactivación del phyB (**Figura 3.3**)

En conjunto, los resultados obtenidos de densidad de tricomas y LMA indican que el phyB modula positivamente diferentes características morfológicas del tejido foliar, asociados directamente con las defensas anti-herbívoro.

### **3.3.3. La proximidad de plantas vecinas reprime las respuestas de defensas mediadas por los jasmonatos a través de la inactivación de phyB.**

En este trabajo se demostró que la inactivación del phyB por una aproximación genética, donde los genes *PHYB1* y *PHYB2* fueron mutados, tiene

un efecto negativo sobre la expresión de genes involucrados en defensa que son inducidos por JA (**Figura 3.4**). Los genes *PIN-2* y *TD*, que codifican para las proteínas inhibidor de proteasa y treonina deaminasa respectivamente, actúan a nivel del tracto digestivo del insecto interrumpiendo la digestión (Ryan, 1990; Chen *et al.*, 2005). El gen *LOXD* codificante de la enzima Lipoxigenasa D está involucrado en los primeros pasos de la biosíntesis del JA (Heitz *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2013b). Por su parte el gen *LOXA*, codificante de la enzima Lipoxigenasa A, es utilizado como marcador de respuesta a MeJA, y su función está relacionada con las defensas en frutos inmaduros y plántulas (Beaudoin y Rothstein, 1997; Griffiths *et al.*, 1999)

En contraposición, la inactivación del phyB no afectó los niveles de expresión del gen *PPO* codificante de la enzima polifenol oxidasa encargada de la oxidación de compuestos fenólicos (Elliger *et al.*, 1981; Stamp y Yang, 1996). También se demostró que la señal de competencia genera diferentes patrones de compuestos terpénicos contenidos dentro del tejido foliar. Estas observaciones fueron un puntapié para indagar en profundidad el comportamiento de estos terpenos en el espacio aéreo de la planta (Capítulo 4). Existen evidencias que la emisión de compuestos volátiles tienen severas implicancias sobre el comportamiento de insectos de otros niveles tróficos del ecosistema (Vet y Dicke, 1992; Heil, 2008b; Aartsma *et al.*, 2017).

Estos resultados son consistentes con trabajos recientes en los cuales se muestra que las plantas expuestas a bajas relaciones R:RL al igual que las mutantes de phyB son menos resistentes al ataque de insectos herbívoros (McGuire y Agrawal, 2005; Izaguirre *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2009; Cerrudo *et al.*, 2012; de Wit *et al.*, 2013). En conjunto, afirman que la proximidad de plantas vecinas ejerce un efecto negativo sobre las señales de defensa mediadas por los JAs a través de la inactivación del phyB. El link funcional en tomate entre phyB y JA es probable que involucre a los mismo protagonistas moleculares que Arabidopsis, donde la inactivación de phyB reprime la señalización de JA debido a un desbalance entre proteínas DELLA y JAZ en favor de esta última (Leone *et al.*, 2014), y por una reducción de la abundancia de los factores de transcripción MYC encargados de activar la expresión de genes de defensa. Estudios recientes en nuestro laboratorio han demostrado que la inactivación de los genes



JAZ permite mantener defensas “altas” en plantas que expresan el SAS en respuesta a la inactivación del phyB (Cerrudo *et al.*, 2012; Cerrudo *et al.*, 2017). Recientemente se ha revelado que las plantas de *Arabidopsis* priorizan la expresión del fenotipo SAS sobre la expresión del sistema de defensas cuando son expuestas a ambos factores en forma simultánea: competencia y patógenos (de Wit *et al.*, 2013). Por lo tanto, en el marco del dilema de las plantas (“crecer o defenderse”) parecería que plantas intolerantes a la sombra (como tomate) priorizan la asignación de recursos al crecimiento cuando detectan un alto riesgo de competencia. ¿Por qué? Bueno, Ballare y Pierik (2017) teorizan que para la planta es ventajoso recortar su presupuesto en defensa cuando todavía hay una disponibilidad importante de recursos, en cambio para poder escapar de la competencia se requiere inversión en crecimiento y nuevas estructuras lo cual hace al proceso más lento y demandante de recursos.

### **3.4.Conclusión**

En este capítulo se demostró por aproximaciones tanto genéticas como fisiológicas que la simulación de la presencia de plantas vecinas produce la inactivación del phyB y evoca el síndrome de escape al sombreado (SAS) en plantas de *Solanum lycopersicum* cultivadas bajo radiación natural.

Se demostró que la inactivación del phyB afecta directamente a la producción de defensas físicas afectando la topografía y textura del tejido foliar. En cuanto a las defensas químicas se demostró que el phyB reprime la activación de las defensas directas dependientes de JA. Particularmente sobre enzimas de defensa inhibitoras de la digestión del herbívoro y de la biosíntesis de JA, como así también modulando negativamente la producción de flavonoides.



## **Capítulo 4**

**El efecto del fitocromo B (phyB) sobre la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) involucrados en las defensas indirectas, y su inducción por MeJA.**

## Capítulo 4

### **El efecto del fitocromo B (phyB) sobre la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) involucrados en las defensas indirectas, y su inducción por MeJA.**

#### **4.1. Introducción**

Las plantas superiores producen un gran número de compuestos químicos capaces de aromatizar el espacio aéreo que las rodea. Estos compuestos conocidos como compuestos orgánicos volátiles (VOCs), son como lo dice su definición volátiles a temperatura ambiente y se encuentran presentes en todos los órganos de las plantas. Los VOCs usualmente se presentan como un *blend* que incluye hidrocarburos saturados y no saturados, ésteres, aldehídos, cetonas, aminas, óxidos, etc. A pesar de que estos compuestos se encuentran en muy pequeñas concentraciones respecto al peso total de la planta, en su conjunto poseen un gran valor comercial y, lo que es más importante, un rol preponderante en la comunicación de las plantas con otros organismos presentes en el ecosistema. Debido a la imposibilidad que tienen las plantas de poder trasladarse en busca de alimento o escapar de un predador, la emisión de VOCs desde hojas, frutos, flores e inclusive raíces es una estrategia evolutiva que le permite a la planta repeler a predadores o atraer a polinizadores y enemigos naturales de plagas. La composición química cuali- y cuantitativa del bouquet de volátiles emitido por las plantas es una radiografía del estatus fisiológico de la planta y de los posibles estreses a los que se encuentra sometida (Gouinguene y Turlings, 2002; Holopainen y Gershenzon, 2010; Catola *et al.*, 2018).

La biosíntesis de VOCs se encuentra regulada por un patrón espacio-desarrollo-tiempo característico de cada especie (Rosenkranz y Schnitzler, 2001). De esta manera la composición del blend de volátiles estará determinada por el tejido donde se producen, el grado de desarrollo del mismo y el momento del día. Su biosíntesis se produce en las células epidérmicas de los tejidos, desde donde son liberados al ambiente. En *Solanum lycopersicum*, la emisión de VOCs se produce a través de los tricomas glandulares, los cuales son

estructuras diferenciadas a partir de celular epidérmicas (Dudareva y Pichersky, 2000; Chen *et al.*, 2004). La emisión de estos compuestos ocurre cuando las estructuras contenedoras son dañadas mecánicamente o bien por difusión simple a través de estomas o células epidérmicas, sin embargo este proceso es algo que todavía no está del todo claro (Niinemets y Reichstein, 2003; Widhalm *et al.*, 2015). Se ha propuesto que este fenómeno podría involucrar cuatro pasos: i) transporte dentro de la célula; ii) transporte a través de la membrana plasmática y la pared celular; iii) transferencia a través de la cutícula y iv) evaporación de la superficie (Jetter, 2006).

La formación de VOCs está regulada espacialmente, los *blends* emitidos por las flores son más complejos y concentrados que los emitidos por los tejidos vegetativos sanos. Ante un evento de herbivoría, la emisión en el *ground zero* es diferente que en los tejidos sanos. La emisión también tiene una regulación temporal. En las flores la liberación aumenta a medida que los órganos florales están listos para ser polinizados, o bien cuando los frutos ya están lo suficientemente maduros (Negre *et al.*, 2003). En cambio en los tejidos vegetativos el pico de emisión se da cuando se produce un daño mecánico, o algunas horas posteriores del ataque de un herbívoro (Paré y Tumlinson, 1999; Arimura *et al.*, 2004). El patrón de emisión en flores y en hojas sanas o atacadas por herbívoros varía marcadamente a lo largo del día (Lu *et al.*, 2002). Particularmente en las flores, los VOCs tienen un patrón rítmico con máximos durante el día o la noche, coincidente con el período de mayor actividad de potenciales polinizadores, todo regulado por el reloj circadiano de la planta (Helsper *et al.*, 1998; Kolosova *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2017). La producción de VOCs también está regulada por el estadio en el desarrollo de la planta. La acumulación en hojas y frutos, y la emisión en flores sigue un patrón muy similar, aumenta durante los primeros estadios del desarrollo de los órganos (hojas jóvenes no expandidas, frutos inmaduros y flores listas para polinización) y se mantienen constantes hasta decrecer con la vida media del órgano (Dudareva *et al.*, 2004). En el caso particular de las flores, la polinización induce una disminución en la emisión de compuestos volátiles florales que comienza luego de que los tubos polínicos alcanzan el ovario (Negre *et al.*, 2003).

Los niveles de emisión de los VOCs están fuertemente afectados por factores ambientales como lo son: la temperatura, la intensidad lumínica, la

concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico, la humedad relativa y la disponibilidad de nutrientes (Gouinguene y Turlings, 2002). La temperatura ambiente tiene un efecto directo sobre la actividad de las monoterpene sintasas (Fischbach *et al.*, 2001), e indirecto al afectar la respiración y de esa manera regular la cantidad de precursores disponibles en el cloroplasto. Elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> atmosférico producen el desacople entre la emisión de volátiles y la fotosíntesis al reducir la disponibilidad de precursores y la actividad de las enzimas terpeno sintasas (Loreto *et al.*, 2001; Rosenstiel *et al.*, 2003). La intensidad lumínica a través de la fotosíntesis regula la cantidad de precursores de la vía de los terpenos (gliceraldehído-3-fosfato), y la disponibilidad de energía y poder reductor (ATP y NADPH). Si bien existe evidencia de cómo estos factores regulan la emisión de VOCs, el modo en que la calidad lumínica, y en especial las bajas relaciones R:RL, afecta el *bouquet* de volátiles es algo que todavía necesita investigarse en profundidad. Existen evidencias en *Arabidopsis* y *Hordeum vulgare* (cebada) que las bajas R:RL afectan la emisión de compuestos volátiles (Kegge *et al.*, 2013; Kegge *et al.*, 2015).

Más allá de la relevancia económica en la industria farmacéutica y cosmética, los VOCs tienen una razón de ser ecológica íntimamente relacionada con la comunicación entre la planta y otros organismos (Rosenkranz y Schnitzler, 2001). Las plantas utilizan los VOCs como mecanismo de defensa frente al ataque de herbívoros y patógenos y, además, como atractores de polinizadores y dispersadores de semillas, lo cual les provee una ventaja adaptativa importante (Pichersky y Gershenzon, 2002; Reinhard *et al.*, 2004). La emisión de volátiles desde los tejidos vegetativos actúa de manera directa repeliendo o intoxicando a los patógenos y herbívoros, o bien de manera indirecta apelando a la acción de enemigos naturales presentes en niveles tróficos superiores (Dicke y Sabelis, 1988b; Kessler y Baldwin, 2001; Vancanneyt *et al.*, 2001; Dicke y Baldwin, 2010). De manera análoga a lo que ocurre en el espacio aéreo, bajo tierra las raíces tienen la capacidad de emitir compuestos volátiles (Wenke *et al.*, 2010). Los volátiles emitidos bajo tierra contribuyen al sistema de defensa directa subterráneo anti-herbívoro o antimicrobiano y, a su vez, de manera indirecta a reclutar enemigos naturales de los herbívoros que se alimentan de las raíces (Rasmann *et al.*, 2005). Las plantas también utilizan los volátiles como una vía de comunicación entre ellas. Los compuestos volátiles emitidos por plantas

dañadas son recibidos por plantas vecinas que de esta manera son alertadas sobre un potencial ataque y movilizan sus sistemas de defensa química hacia un estado de pre-inducción o *priming*, el cual les permite responder de manera más rápida a un futuro ataque (Heil, 2014). En cambio, en plantas sanas la emisión de volátiles puede inhibir el crecimiento de plantas vecinas, proceso conocido como alelopatía (Nishida *et al.*, 2005). En cambio, en plantas parásitas, los volátiles son una fuente de información para reconocer y localizar a la planta huésped, como es el caso de *Cuscuta pentagona* y *Solanum lycopersicum* (Runyon *et al.*, 2006). Este fenómeno de comunicación planta-planta fue descrito por primera vez por Baldwin y Schultz (1983), sin embargo hasta el día de hoy no hay certeza acerca de los receptores que las plantas emplean para percibir esos volátiles.

Como he mencionado anteriormente las plantas tienen la capacidad de producir una diversa cantidad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales son liberados al ambiente de manera constitutiva, o bien luego de la deposición de huevos o el ataque de un herbívoro. Estos compuestos volátiles de plantas inducidos por herbivoría (HIPVs, *Herbivore Induced Plant Volatiles*) son mayormente terpenoides y derivados de ácidos grasos presentes en la membrana plasmática de las células, que pueden ser emitidos localmente, donde se produjo el daño, como así también de manera sistémica en partes sanas de la misma planta. A pesar de que el nombre de estos compuestos nos dice que son inducidos por herbivoría, existe evidencia que las plantas también pueden producir HIPVs con solo percibir el movimiento del herbívoro sobre sus tejidos (Hall *et al.*, 2004; Peiffer *et al.*, 2009) o las vibraciones generadas por la masticación (Appel y Coccoft, 2014). Los blends de HIPVs suelen ser mezclas de decenas o cientos de compuestos diferentes, de los cuales algunos pueden estar presentes de manera constitutiva y otros producirse *de novo* en respuesta al contacto con el herbívoro.

Los compuestos volátiles provenientes de una planta dañada por un herbívoro no se componen como una simple emisión desde el sitio lesionado. El daño generado localmente por el herbívoro activa una respuesta sistémica de las defensas produciendo entre otras cosas la liberación de HIPVs que tapizan por completo el espacio aéreo de la planta y los alrededores subterráneos. Así la fuente de volátiles se ve amplificada en toda la planta lo que genera una señal más fuerte que si la emisión estuviera concertada en el sitio dañado (Dicke,

2009). Si bien los HIPVs son considerados como un sistema de defensa indirecto inducido, su presencia en el ambiente genera cambios en el comportamiento de varios miembros de una comunidad (artrópodos carnívoros, nematodos entomopatogénicos, parasitoides, aves insectívoras, micorrizas, plantas vecinas conespecíficas y plantas parásitas) y como consecuencia de cómo interaccionan entre ellos (Dicke y Baldwin, 2010) (**Figura 4.1**).

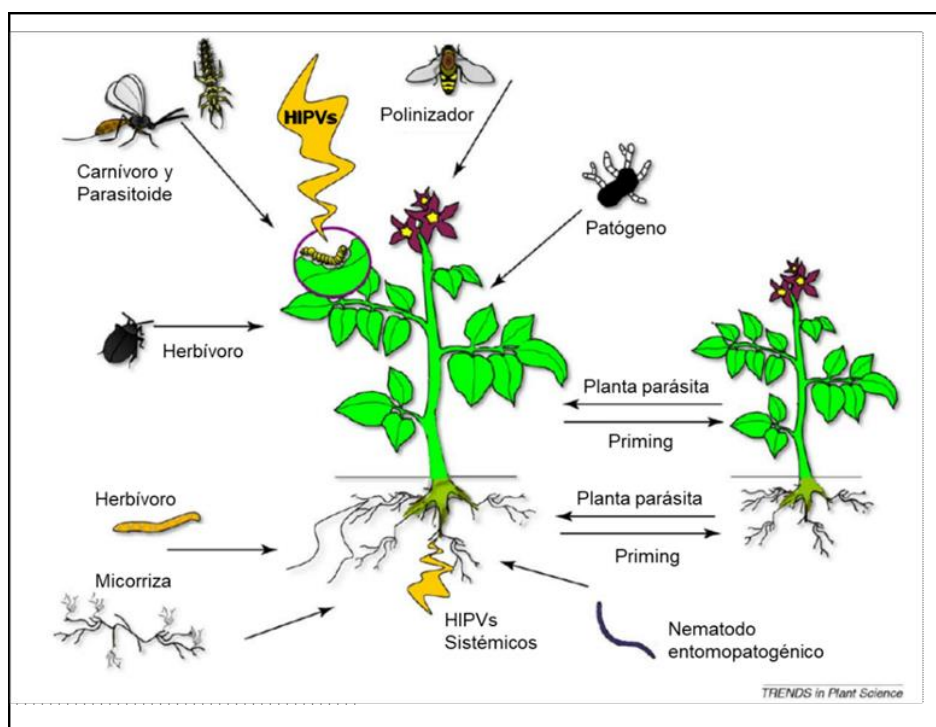
La dinámica de liberación de HIPVs varía altamente según la especie vegetal en cuanto a tiempos y compuestos liberados en el *ground zero*, sin embargo podemos modelar un mecanismo general que puede ser adoptado para comprender cómo se desencadena el proceso (Turlings y Erb, 2018). A su vez, las diferentes clases de HIPVs tienen diferentes patrones de emisión en términos de volatilidad, abundancia o ritmo que adicionalmente varían dependiendo del horario que se efectuó el ataque y el tiempo transcurrido posterior (Joo *et al.*, 2018). Inmediatamente luego y en simultáneo con el ataque del herbívoro se libera en el *ground zero* una gran cantidad de compuestos denominados volátiles de hojas verdes (GLVs, *Green Leaf Volatiles*), nombre derivado por similitud con la fragancia percibida por los humanos al césped recién cortado. Los GLVs son una familia de compuestos de seis carbonos (C6) conformada por aldehídos, ésteres y alcoholes sintetizados a través de la vía de las oxilipinas a partir de los ácidos grasos provenientes de la ruptura de las membranas por parte del herbívoro (Scala *et al.*, 2013). Además de los GLVs, distintos VOCs almacenados en tricomas y órganos de reserva son liberados como consecuencia de la ruptura de los tejidos. Algunas horas posteriores al ataque se produce la liberación sistémica de compuestos volátiles, mayormente monoterpenos y sesquiterpenos, como así también GLVs, que son sintetizados *de novo* en tejidos sanos (Turlings y Erb, 2018).

Las emisiones de VOCs están fuertemente afectadas por factores ambientales, sin embargo muy poco se sabe del efecto del ambiente sobre los VOCs inducidos por herbivoría (Kegge y Pierik, 2010; Mumm y Dicke, 2010; Pierik *et al.*, 2014). Existe evidencia que sugiere que la emisión de HIPVs involucrados en las defensas anti-herbívoro están controlados por el JA (Arimura *et al.*, 2005; Mumm y Dicke, 2010; Ponzio *et al.*, 2013; Scala *et al.*, 2013) y teniendo en cuenta que el phyB es un importante modulador de la señalización del JA (Ballare, 2014), es razonable esperar que los perfiles de VOCs emitidos



por plantas en respuesta a la herbivoría puedan verse afectados por la calidad de luz del ambiente. Sin embargo existe muy poca evidencia para suponer que esto ocurra de esta manera (Kegge y Pierik, 2010; Kegge *et al.*, 2013; Pierik *et al.*, 2014). Trabajos recientes en *Arabidopsis* han demostrado que las bajas R:RL y el sombreado del canopy afecta el blend de volátiles emitidos por plantas sanas e inducidas con MeJA (Kegge *et al.*, 2013).

El objetivo de este capítulo es determinar el efecto que tiene la inactivación del phyB sobre los blends de compuestos volátiles involucrados en los sistemas de defensa indirectos anti-herbívoro. Para ello, se estudiaron los perfiles de volátiles en plantas *wild-type* y mutantes de phyB en condiciones control e inducidas con MeJA, bajo condiciones de radiación natural y con suplementación de luz RL.



**Figura 4.1.** Herbivoría y producción de HIPVs. Cuando una planta es atacada por un herbívoro se produce la liberación de compuestos volátiles inducidos por herbivoría (HIPVs) de manera local y sistémica, en el espacio aéreo y subterráneo de la planta. Los HIPVs tienen un efecto sobre varios individuos presente en el ecosistema (enemigos naturales, aves insectívoras, polinizadores, plantas vecinas conespecíficas, plantas parásitas, etc.), donde cada uno ejerce una presión de selección sobre la planta. Modificado de Dicke y Baldwin (2010)

## 4.2.Resultados

### 4.2.1. La inactivación del phyB, en plantas inducidas con MeJA, produce cambios en el blend de VOCs emitidos.

Hasta el momento hemos demostrado como el phyB modula las defensas directas constitutivas e inducibles, a través de cambios en la arquitectura foliar y en la atenuación de la respuesta al MeJA. En esta sección investigamos cómo los cambios el status del phyB pueden alterar el patrón de compuestos volátiles inducibles, para tal fin desarrollamos un ensayo con dos status de phyB y dos niveles de inducción con MeJA, resultando en cuatro combinaciones genotipos X tratamiento: Plantas control WT (WC), plantas control *phyB1phyB2* (pC), plantas WT inducidas con MeJA (WJ) y plantas *phyB1phyB2* inducidas con MeJA (pJ). Entre las cuatro combinaciones genotipo x tratamiento se encontró que el espacio aéreo de las plantas estaba conformado por un blend de 69 VOCs diferentes, los cuales estaban al menos en un 50% de las muestras de cada combinación (**Tabla 4.1**).

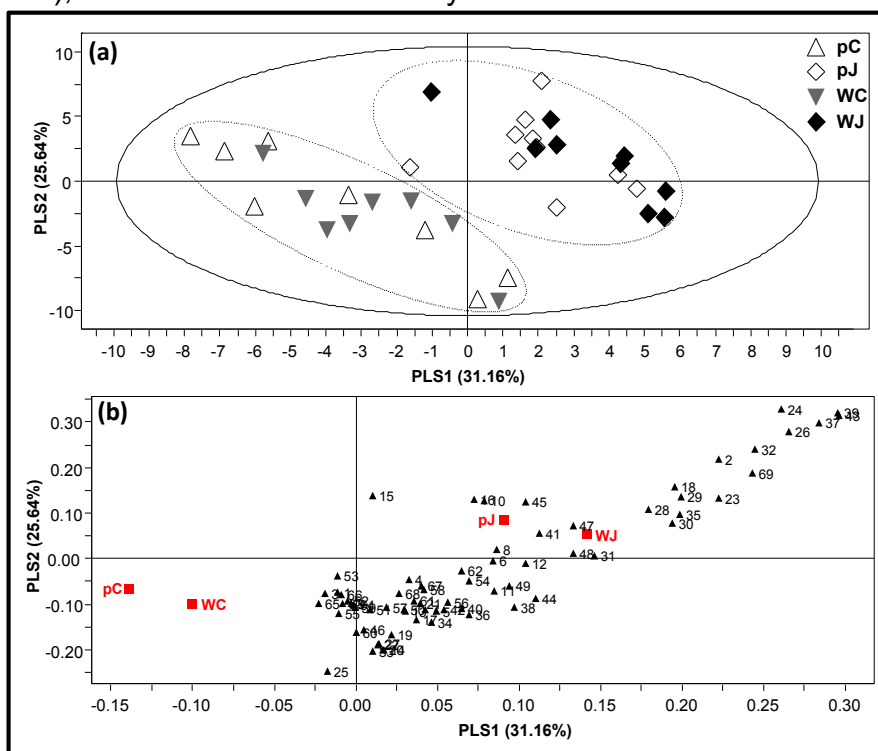
No <sup>A</sup>	Compuesto	Clase	Valores cuantitativos de VOCs <sup>B</sup>				Valor VIP <sup>C</sup>
			WC (n=8)	WJ (n=9)	pC (n=8)	pJ (n=10)	
1	1-Penten-3-ol	Alcohol	1,28±0,30	1,62±0,34	2,17 ± 0,57	2,02±1,10	0,34
2	3-Pentanol	Alcohol	4,94±0,25 <sup>a</sup>	16,14±2,47 <sup>b</sup>	8,09 ± 1,71 <sup>a</sup>	15,67±3,55 <sup>b</sup>	<b>1,41</b>
3	(E)-2-Hexenal	Aldehído	0,13±0,08	0,27±0,08	0,27 ± 0,09	0,57±0,40	0,30
4	(Z)-3-Hexen-1-ol	Alcohol	2,87±1,20	5,67±1,39	4,91 ± 1,16	6,83±4,05	0,45
5	α-Tujeno	Terpeno	7,05±0,48	7,31±0,62	6,64 ± 0,89	7,04±0,41	0,61
6	α-Pineno	Terpeno	132,89±12,76	147,28±11,94	126,85 ± 9,87	139,58±6,83	0,52
7	α-Fencheno	Terpeno	1,42±0,08	1,51±0,17	1,45 ± 0,28	1,50±0,11	0,62
8	3,7,7-Trimetil-1,3,5-heptatrieno	Terpeno	287,71±113,71 <sup>a</sup>	373,00±88,84 <sup>b</sup>	85,85 ± 20,10 <sup>ab</sup>	95,00±15,76 <sup>b</sup>	<b>1,40</b>
9	Sabineno	Terpeno	17,03±3,35	18,83±4,15	16,69 ± 2,69	15,28±1,08	0,44
10	β-Pineno	Terpeno	7,62±0,60	8,06±0,49	6,20 ± 1,06	8,75±0,80	0,89
11	trans-m-Menta-4,8-dieno	Terpeno	21,29±3,17	25,91±4,95	17,32 ± 4,95	22,03±3,86	0,69
12	β-Mirceno	Terpeno	118,80±27,00	162,23±22,64	140,24 ± 29,24	167,86±19,02	<b>1,10</b>
13	2-Careno	Terpeno	2889,58±230,00	3052,95±242,97	3188,93 ± 494,92	3145,95±135,27	0,88
14	α-Felandreno	Terpeno	790,42±133,05	789,14±107,72	720,32 ± 193,86	598,29±64,43	0,84
15	3-Careno	Terpeno	6,35±2,82	14,87±5,13	16,40 ± 3,54	16,92±3,52	0,65
16	α-Terpineno	Terpeno	278,66±42,39	230,50±26,92	225,98 ± 52,50	327,10±22,53	0,81
17	β-Felandreno	Terpeno	12064,09±888,56	12403,97±685,24	12018,75 ± 1560,87	12008,72±429,44	<b>0,66</b>
18	trans-β-Ocimeno	Terpeno	33,84±9,13 <sup>a</sup>	111,95±17,22 <sup>b</sup>	70,25 ± 19,93 <sup>ab</sup>	123,53±15,56 <sup>b</sup>	<b>1,62</b>
19	β-Terpineno	Terpeno	2,88±0,54	2,84±0,42	2,64 ± 0,83	2,36±0,43	0,74
20	γ-Terpineno	Terpeno	103,56±19,15	102,88±15,12	96,27 ± 29,56	74,98±7,80	0,84
21	Isoterpinoleno	Terpeno	1,71±0,53	1,41±0,31	1,44 ± 0,44	0,78±0,14	0,80
22	Terpinoleno	Terpeno	111,24±19,86	114,82±16,68	123,80 ± 40,41	93,26±10,20	0,74
23	(Z)-3-Hexen-1-ol propanoato	Ester	0,35±0,08 <sup>a</sup>	5,58±1,63 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,25±0,97 <sup>b</sup>	<b>1,28</b>
24	Linalool	Terpeno	ND	1,02±0,23	ND	1,01±0,19	<b>1,52</b>
25	p-Menta-1,3,8-trieno	Terpeno	5,05±0,72	4,49±0,43	4,05 ± 0,79	3,40±0,26	<b>1,07</b>
26	(E)-DMNT	Terpeno	0,69±0,25 <sup>a</sup>	5,65±0,79 <sup>b</sup>	0,86 ± 0,17 <sup>a</sup>	4,20±0,79 <sup>b</sup>	<b>1,56</b>
27	3,4-Dimetilbencil alcohol	Terpeno	32,88±7,58	33,60±5,73	36,14 ± 12,31	26,39±3,18	0,74
28	Allo-Ocimeno	Terpeno	0,18±0,09 <sup>a</sup>	0,56±0,12 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,13 <sup>ab</sup>	0,41±0,09 <sup>ab</sup>	<b>1,13</b>
29	(E,E)-Cosmeno	Terpeno	0,33±0,30	0,32±0,07	0,09 ± 0,04	0,23±0,04	<b>1,10</b>
30	cis-Limoneno oxido	Terpeno	2,37±0,37 <sup>a</sup>	4,06±0,45 <sup>b</sup>	2,18 ± 0,56 <sup>a</sup>	3,86±0,45 <sup>ab</sup>	<b>1,07</b>
31	1,3,5-tris(metilen) cicloheptano	Terpeno	15,98±1,87	20,18±1,88	13,81 ± 2,52	19,57±1,72	0,86
32	(Z)-3-Hexen-1-ol isobutirato	Ester	ND	0,44±0,17	ND	0,30±0,09	<b>1,36</b>
33	Sirenina	Terpeno	1,14±0,19	1,15±0,20	0,85 ± 0,17	0,78±0,09	0,96
34	Pulegon	Terpeno	0,57±0,06	0,64±0,08	0,43 ± 0,09	0,40±0,04	<b>1,18</b>
35	trans-2-Caren-4-ol	Terpeno	12,86±1,68 <sup>a</sup>	24,98±2,98 <sup>b</sup>	13,27 ± 3,52 <sup>a</sup>	25,33±3,32 <sup>b</sup>	<b>1,12</b>
36	trans-3(10)-Caren-2-ol	Terpeno	15,13±1,10 <sup>ab</sup>	17,07±1,30 <sup>a</sup>	12,88±1,84 <sup>ab</sup>	12,88±0,64 <sup>b</sup>	<b>1,09</b>
37	(Z)-3-Hexenil butirate	Ester	ND	12,17±2,70	ND	6,25±1,97	<b>1,60</b>
38	Anetofuran	Terpeno	75,98±25,10	98,59±19,52	50,06±16,51	47,51±4,48	<b>1,11</b>
39	Hexilbutanoato	Ester	ND	0,30±0,08	ND	0,13±0,03	<b>1,67</b>
40	Dihidrocarveol	Terpeno	3,97±0,83	4,47±0,58	3,58±1,06	3,27±0,31	0,69

No <sup>A</sup>	Compuesto	Clase	Valores cuantitativos de VOCs <sup>B</sup>				Valor VIP <sup>C</sup>
			WC (n=8)	WJ (n=9)	pC (n=8)	pJ (n=10)	
41	Metil-salicilato	Ester	ND	0,80±0,17	0,26±0,15	0,57±0,21	0,85
42	Monoterpeno desconocido	Terpeno	6,63±1,31	7,45±0,93	6,58±1,75	5,86±0,52	0,62
43	(Z)-3-Hexenil isovalerato	Ester	ND	0,74±0,27	ND	0,66±0,19	<b>1,66</b>
44	Cuminaldehído	Aldehído	5,96±0,71	7,04±0,58	4,79±0,60	5,36±0,33	<b>1,10</b>
45	3-Caren-2-ona	Terpeno	0,27±0,06	0,53±0,12	0,41±0,07	0,53±0,10	0,98
46	Pipertona	Terpeno	2,18±0,42	1,81±0,21	1,36±0,33	1,26±0,13	<b>1,33</b>
47	2-Caren-10-al	Aldehído	0,32±0,07 <sup>ab</sup>	0,55±0,06 <sup>a</sup>	0,28±0,08 <sup>b</sup>	0,53±0,10 <sup>ab</sup>	0,86
48	p-Mentaa-1,3-dien-7-al	Terpeno	1,13±0,14	1,84±0,23	1,37±0,29	1,62±0,20	0,86
49	Piperitenona	Terpeno	0,84±0,17	1,14±0,17	0,80±0,19	0,95±0,16	0,68
50	δ-Elemeno	Terpeno	30,94±6,90	33,18±4,78	33,45±7,77	34,29±5,41	0,77
51	α-Cubebeno	Terpeno	0,09±0,02	0,09±0,01	0,09±0,02	0,09±0,02	0,63
52	Cloveno	Terpeno	0,16±0,07	0,14±0,03	0,15±0,05	0,13±0,03	0,52
53	α-Copaeno	Terpeno	1,09±0,37	1,63±0,84	0,79±0,12	0,81±0,18	0,12
54	β-Elemeno	Terpeno	1,85±0,47	2,04±0,26	1,74±0,33	2,08±0,27	0,74
55	(E)-β-Cariofileno	Terpeno	116,26±18,71	113,14±14,98	129,76±23,42	135,15±21,33	0,93
56	γ-Elemeno	Terpeno	0,30±0,12	0,28±0,04	0,21±0,05	0,21±0,03	0,59
57	Guaia-6,9-dieno	Terpeno	1,21±0,16	1,34±0,20	1,34±0,23	1,38±0,17	0,81
58	Aromadendreno	Terpeno	0,24±0,06	0,27±0,05	0,26±0,05	0,28±0,05	0,77
59	α-Cariofileno	Terpeno	54,48±8,72	55,21±7,21	62,16±11,77	64,80±10,03	0,93
60	Isobiciclogermacreno	Terpeno	0,40±0,10	0,38±0,07	0,26±0,03	0,25±0,03	0,76
61	Valenceno	Terpeno	0,64±0,17	0,73±0,17	0,56±0,15	0,57±0,09	0,47
62	Biciclosesqui-felandreno	Terpeno	4,00±0,44	5,35±0,78	4,98±1,01	5,77±0,81	0,96
63	cis-β-Guaieno	Terpeno	0,45±0,11	0,46±0,10	0,57±0,13	0,54±0,08	<b>1,01</b>
64	δ-Selineno	Terpeno	0,51±0,15	0,49±0,10	0,64±0,17	0,58±0,10	0,97
65	γ-Pachuleno	Terpeno	0,16±0,03	0,16±0,02	0,20±0,03	0,18±0,02	0,96
66	Germacreno A	Terpeno	0,33±0,08	0,34±0,04	0,44±0,07	0,40±0,06	<b>1,18</b>
67	Biciclogermacreno	Terpeno	0,62±0,08	0,82±0,13	0,85±0,18	0,86±0,11	<b>1,06</b>
68	Germacreno B	Terpeno	1,05±0,15	1,16±0,15	1,26±0,25	1,34±0,17	<b>1,01</b>
69	(E,E)-TMTT	Terpeno	24,07±7,28 <sup>a</sup>	56,02±12,68 <sup>b</sup>	4,45±0,28 <sup>c</sup>	24,62±2,78 <sup>ab</sup>	<b>1,97</b>

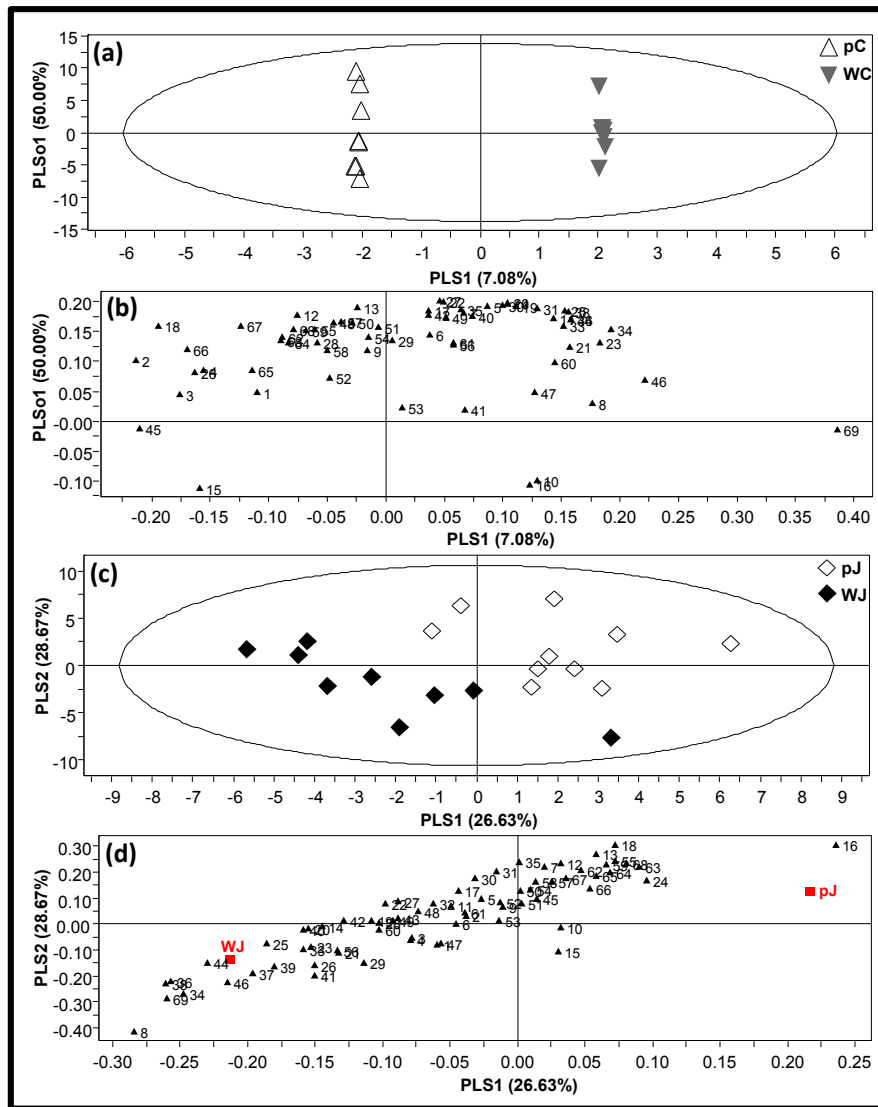
**Tabla 4.1.** Compuestos volátiles detectados en el espacio aéreo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) *wild-type* y mutantes *phyB*. Tratamientos: *wild-type* control (WC); *phyB1phyB2* control (pC); *wild-type* tratado con MeJA (WJ); *phyB1phyB2* tratado con MeJA (pJ). Los compuestos se encuentran dispuestos de acuerdo a su orden de elución <sup>A</sup> Los números se correlacionan con los presentados en el *loading plot* de la Figuras 4.2, 4.3 y 4.4.<sup>B</sup> Mediciones cuantitativas de las emisiones de compuestos volátiles en plantas WT y *phyB1phyB2*, control (WC, pC) e inducidas con MeJA (450 μM) (WJ, pJ). Los valores se expresan como área promedio del pico ± error standard por gramo de tejido foliar fresco dividido por 10<sup>4</sup>. Para cada compuesto letras diferentes indican diferencias significativas entre medias (Kruskal-Wallis; *P*<0.05).<sup>C</sup> Valor VIP (Valores de la Importancia de la variable en la proyección) para el análisis de PLS-DA correspondiente a la figura 4.2. ND: Compuesto no detectado en un tratamiento; (E)-DMNT: (E)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno; (E,E)-TMTT: (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno.

En los tratamientos control (WC y pC) se detectaron 64 compuestos, mientras que en el tratamiento con MeJA (WJ y pJ) el número de compuestos ascendió a 69. La totalidad de los VOCs detectados en los cuatro tratamientos fueron sometidos a un análisis multivariado usando el método del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, *Projection to Latent Structures Discriminant Analysis*). Como resultado se obtuvo un modelo con tres componentes principales, de los cuales los dos primeros representaron el 31,2% y 25,6% de la variación total (**Figura 4.2a**). El tercer componente representó el 8,8% de la variación total. El análisis de PLS-DA basado en el blend de volátiles

generó dos clústeres, control y MeJA, independientes del genotipo. En este modelo, se identificaron 26 compuestos con valores  $VIP \geq 1$ , que contribuyeron en mayor medida a la separación de los blends del espacio aéreo de las plantas (**Tabla 4.1**). Las plantas tratadas con MeJA se vieron influenciadas en la emisión de mono- y homoterpenos acíclicos: (*E*)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno ((*E*)-DMNT), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno ((*E,E*)-TMTT), linalool, *allo*-ocimeno, *trans*- $\beta$ -ocimeno, (*E,E*)-cosmeno; monoterpenos cíclicos: *trans*-2-caren-4-ol y *cis*-limoneno oxido; y compuestos derivados de ácidos grasos ((3-pentanol y volátiles de hojas verdes (GLV): hexil-butanoato; (Z)-3-hexenil isovalerato; (Z)-3-hexenil butirato; (Z)-3-hexen-1-isobutirato y (Z)-3-hexen-1-ol propanoato), todos con valores VIP mayores a 1.



**Figura 4.2.** Efecto del MeJA y la inactivación del phyB sobre el blend de compuestos volátiles colectados del espacio aéreo de plantas de tomate. **(a)** Separación de los grupos de plantas según la composición del espacio aéreo utilizando un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Se observa un *score-plot* bidimensional utilizando los dos primeros componentes del PLS. **(b)** *Loading plot* indicando la contribución de cada volátil a la separación de los grupos. Los tratamientos utilizados fueron *wild-type* control (WC, n=8); *phyB1phyB2* control (pC, n=8); *wild-type* inducido con MeJA (450  $\mu$ M) (WJ, n=9) y *phyB1phyB2* inducido con MeJA (450  $\mu$ M) (pJ, n=10). Para identificar la identidad de un compuesto en relación con la numeración del *loading plot* referirse a la **Tabla 4.1**.



**Figura 4.3.** Efecto de la inactivación del *phyB* sobre el *blend* de compuestos volátiles emitidos por plantas control e inducidas con MeJA. **(a)** *Score plot* resultante de la comparación directa de a pares por OPLS-DA (análisis discriminante ortogonal de mínimos cuadrados parciales entre plantas control WT y *phyB1phyB2* (WC, pC, n=8). **(b)** *Loading plot* con la contribución de cada compuesto volátil en la separación entre los tratamientos WC y pC. **(c)** Mismo análisis que en (a) entre plantas WT y *phyB1phyB2* inducidas con MeJA (450  $\mu$ M) (WJ, n=9; pJ, n=10). **(d)** *Loading plot* con la contribución de cada compuesto volátil en la separación de los tratamientos WJ y pJ. Para identificar la identidad de un compuesto en relación con la numeración del *loading plot* referirse a la **Tabla 4.1**.

En una comparación directa de a pares por OPLS-DA (análisis discriminante ortogonal de mínimos cuadrados parciales), una extensión del PLS-DA, en donde se considera la variación dentro de un mismo grupo de muestras, se analizó al grupo de plantas control WT y *phyB1phyB2* (WC, pC)

(Figura 4.3). El *score plot* bidimensional resultante basado en el primer componente predictivo del modelo y el primer componente ortogonal reveló diferencias en la composición del espacio aéreo de los grupos de plantas. Un grupo de 25 compuestos con valores  $VIP \geq 1$ , casi el 36 % del total de los compuestos volátiles encontrados en el *headspace*, fueron los determinantes en la separación entre los grupos. El espacio aéreo de las plantas WC estuvo caracterizado por 16 compuestos volátiles, mayormente monoterpenos cíclicos, mientras que el blend de volátiles característicos de las plantas pC estuvo conformado por 9 compuestos (dos monoterpenos cíclicos, dos sesquiterpenos, un homoterpeno, un monoterpeno acíclico y tres derivados de ácidos grasos) (Tabla 4.1, Figura 4.3b). Los homoterpenos, (*E,E*)-TMTT y (*E*)-DMNT se correlacionaron uno con cada grupo de muestras: (*E,E*)-TMTT lo hizo con las plantas WT, mientras que (*E*)-DMNT con las plantas mutantes de phyB. A pesar del gran número de VOCs identificado en el *headspace* (64), de los cuales 25 fueron significativos en la separación de los grupos de muestras, solo el homoterpeno (*E,E*)-TMTT y el monoterpeno cíclico pipertona fueron emitidos en cantidades diferentes por los grupos WC y pC (Tabla 4.2).

De manera similar al análisis de los grupos WC y pC, se realizó una comparación directa de a pares por PLS-DA entre los grupos de plantas WT y *phyB1phyB2* tratadas con MeJA. Como resultado se obtuvo un modelo con cuatro componentes principales significativos, con los primeros dos explicando el 26.6% y el 28,7% total de la varianza (Figura 4.3c, d). Del total de 69 compuestos volátiles presentes en el espacio aéreo de la planta, un grupo de 24 compuestos con valores  $VIP \geq 1$  fueron los que contribuyeron de manera significativa a la diferenciación de los blends de las plantas WJ y pJ. La mayoría de los compuestos volátiles pertenecían a la familia de los terpenos y GLVs. Los terpenos 3,7,7-trimetil-1,3,5-cicloheptatrieno, pulegon, anetofuran, *trans*-3(10)-caren-2-ol, *p*-menta-1,3,8-trieno y (*E,E*)-TMTT, fueron emitidos en cantidades significativamente superiores por las plantas WJ comparadas con las pJ (Tabla 4.3). Por el contrario, el terpeno  $\alpha$ -terpineno se encontró en cantidades significativamente mayores en los blends de las plantas pJ.

Estos resultados demuestran que la inactivación del phyB mediante una estrategia genética produce alteraciones en la emisiones de compuestos volátiles en plantas inducidas con MeJA.

No <sup>A</sup>	Compuesto	Valores cuantitativos de VOCs <sup>B</sup>		P-valor	Valor VIP <sup>C</sup>
		WC (n=8)	pC (n=8)		
69	(E,E)- TMTT	24.07±7.28	4.45 ±0.28	<b>0.001</b>	3.09
46	Pipertona	2.18±0.42	1.36±0.33	<b>0.021</b>	1.78
2	3-Pentanol	4.94±0.25	8.09±1.71	0.105	1.72
45	3-Caren-2-ona	0.27±0.06	0.41±0.07	0.083	1.69
18	<i>trans</i> -β-Ocimeno	33.84±9.13	70.25±19.93	0.195	1.55
34	Pulegon	0.57±0.06	0.43±0.09	0.279	1.53
23	(Z)-3-Hexen-1-ol propanoato	0.35±0.08	0.23±0.09	0.374	1.46
8	3,7,7-Trimetil-1,3,5-cicloheptatrieno	287.71±113.71	85.85±20.10	0.161	1.42
3	(E)-2-Hexenal	0.13±0.08	0.27±0.09	0.161	1.40
66	Germacreno A	0.33±0.08	0.44±0.07	0.13	1.35
26	(E)-DMNT	0.69±0.25	0.86±0.17	0.083	1.30
15	3-Careno	6.35±2.82	16.40±3.54	0.052	1.28
21	Isoterpinoleno	1.71±0.53	1.44±0.44	0.773	1.26
44	Cuminaldehido	5.96±0.71	4.79±0.06	0.279	1.26
4	(Z)-3-Hexen-1-ol	2.87±1.20	4.91±1.16	0.235	1.25
36	<i>trans</i> -3(10)-Caren-2-ol	15.13±1.10	12.88±1.84	0.442	1.25
38	Anetofuran	75.98±25.10	50.06±16.51	0.279	1.25
25	<i>p</i> -Mentha-1,3,8-trieno	5.05±0.72	4.05±0.79	0.279	1.23
33	Sirenina	1.14±0.19	0.85±0.17	0.195	1.22
60	Isobiclogermacreno	0.40±0.10	0.26±0.03	0.382	1.16
11	<i>trans</i> -m-Menta-4,8-dieno	21.29±3.17	17.32±4.95	0.442	1.13
31	1,3,5-tris(metilen) cicloheptano	15.98±1.87	13.81±2.52	0.382	1.03
47	2-Caren-10-al	0.32±0.07	0.28±0.08	0.721	1.03
10	β-Pineno	7.62±0.60	6.20±1.06	0.442	1.02
67	Biclogermacreno	0.62±0.08	0.85±0.18	0.645	1.00

**Tabla 4.2.** Compuestos volátiles detectados en el espacio aéreo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) *wild-type* y mutante de *phyB* control. Los compuestos se encuentran ordenados de acuerdo a su contribución en la separación de los tratamientos control. Tratamientos: *wild-type* control (WC) *yphyB1phyB2* control (pC).<sup>A</sup> Los números se correlacionan con los presentados en el *loading plot* de la Figuras 4.2, 4.3 y 4.4.<sup>B</sup> Mediciones cuantitativas de las emisiones de compuestos volátiles en plantas WT y *phyB1phyB2*, control (WC, pC). Los valores se expresan como área promedio del pico ± error standard por gramo de tejido foliar fresco dividido por 10<sup>4</sup>. Las diferencias significativas entre tratamientos se observan con un *P*-valor en negrita (Mann-Whitney U test; *P*<0.05).<sup>C</sup> Valor VIP (Valores de la Importancia de la variable en la proyección) para el análisis de PLS-DA correspondiente a la figura 4.2. (E)-DMNT: (E)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno; (E,E)-TMTT: (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno.

No <sup>A</sup>	Compuesto	Valores cuantitativos de VOCs <sup>B</sup>		P-valor	Valor VIP <sup>C</sup>
		WJ (n=8)	pJ (n=8)		
8	3,7,7-Trimetil-1,3,5-cicloheptatrieno	373.00±88.84	95.00±15.76	<b>0.008</b>	1.83
34	Pulegon	0.64±0.08	0.40±0.04	<b>0.017</b>	1.61
69	(E,E)- TMTT	56.02±12.68	24.62±2.78	<b>0.01</b>	1.55
36	trans-3(10)-Caren-2-ol	17.07±1.30	12.72±0.64	<b>0.002</b>	1.51
38	Anetofuran	98.59±19.52	47.51±4.48	<b>0.022</b>	1.51
16	α-Terpineno	230.50±26.92	327.10±22.53	<b>0.022</b>	1.43
44	Cuminaldehído	7.04±0.58	5.36±0.33	0.065	1.35
46	Pipertona	1.81±0.21	1.26±0.13	0.054	1.33
37	(Z)-3-Hexenilbutirato	12.17±2.70	6.25±1.97	0.094	1.31
39	Hexilbutanoato	0.30±0.08	0.13±0.03	0.129	1.23
35	trans-2-Caren-4-ol	24.98±2.98	25.33±3.32	0.905	1.22
32	(Z)-3-Hexen-1-ol isobutirato	4.49±0.43	3.4±0.26	0.603	1.17
25	p-Menta-1,3,8-trieno	4.49±0.17	3.40±0.09	<b>0.035</b>	1.16
18	trans-β-Ocimeno	5.65±0.79	4.20±0.79	0.497	1.13
23	(Z)-3-Hexen-1-ol propanoato	111.95±17.22	123.53±15.56	0.243	1.12
26	(E)-DMNT	5.58±1.63	3.25±0.97	0.315	1.11
33	Sirenina	1.15±0.20	0.78±0.09	0.113	1.08
40	Dihidrocarveol	4.47±0.58	3.27±0.31	0.095	1.05
56	γ-Elemeno	0.28±0.04	0.21±0.03	0.400	1.05
20	γ-Terpineno	102.88±15.12	74.98±7.80	0.243	1.04
31	1,3,5-tris(metilen) cicloheptano	0.74±0.27	0.66±0.19	0.72	1.04
43	(Z)-3-Hexenil isovalerato	20.18±1.88	14.57±1.72	0.842	1.03
13	2-Careno	3052.95±242.97	3145.95±135.27	0.782	1.02
41	Metilsalicilato	0.80±0.17	0.57±0.21	0.395	1.00

**Tabla 4.3.** Compuestos volátiles detectados en el espacio aéreo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) *wild-type* y mutantes de *phyB* inducidas con MeJA. Los compuestos se encuentran ordenados de acuerdo a su contribución en la separación de los tratamientos.<sup>A</sup> Los números se correlacionan con los presentados en el *loading plot* de la Figuras 4.2, 4.3 y 4.4.<sup>B</sup> Mediciones cuantitativas de las emisiones de compuestos volátiles en plantas WT y *phyB1phyB2* inducidas con MeJA, (WJ, pJ). Los valores se expresan como área promedio del pico ± error standard por gramo de tejido foliar fresco dividido por 10<sup>4</sup>. Las diferencias significativas entre tratamientos se observan con un *P*-valor en negrita (Mann-Whitney U test; *P*<0.05).<sup>C</sup> Valor VIP (Valores de la Importancia de la variable en la proyección) para el análisis de PLS-DA correspondiente a la figura 4.2. (E)-DMNT: (E)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno; (E,E)-TMTT: (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno.

#### 4.2.2. La inactivación del *phyB* por métodos fisiológicos o genéticos genera patrones similares de emisión de VOCs.

En esta sección investigamos cómo los cambios en status del *phyB* pueden alterar el patrón de compuestos volátiles, ya no empleando una aproximación genética, sino manipulando el entorno lumínico de la planta. Para tal fin se analizaron los perfiles de compuestos volátiles emitidos de plantas WT tratadas con MeJA crecidas bajo radiación natural (WJ), y bajo radiación natural suplementadas con luz RL (WRLJ). La suplementación con radiación RL reduce



la concentración de la forma activa del fotorreceptor (Pfr). Los resultados obtenidos muestran claramente que en las plantas tratadas con MeJA, los perfiles de emisión de VOCs se ven afectados por la suplementación con radiación RL y la consecuente inactivación del phyB.

No <sup>A</sup>	Compuesto	Valores cuantitativos de VOCs <sup>B</sup>		<i>P</i> -valor	Valor VIP <sup>C</sup>
		WJ (n=9)	WRLJ (n=9)		
47	2-Caren-10-al	0.55±0.06	1.44±0.14	<b>0.001</b>	1.82
16	α-Terpineno	230.50±26.92	462.68±22.42	<b>0.001</b>	1.70
69	( <i>E,E</i> )- TMTT	56.02±12.68	15.98±2.47	<b>0.001</b>	1.59
17	β-Felandreno	12403.97±685.24	16414.94±592.17	<b>0.002</b>	1.57
6	α-Pineno	147.28±11.94	206.69±7.72	<b>0.001</b>	1.50
36	<i>trans</i> -3(10)-Caren-2-ol	17.07±1.30	12.89±0.35	<b>0.004</b>	1.39
5	α-Tujeno	7.31±0.62	9.40±0.30	<b>0.019</b>	1.32
45	3-Caren-2-one	0.53±0.12	0.87±0.07	<b>0.014</b>	1.31
41	Metil salicilato	0.80±0.17	5.56±0.97	<b>0.001</b>	1.31
34	Pulegon	0.64±0.08	0.43±0.03	<b>0.040</b>	1.30
23	( <i>Z</i> )-3-Hexen-1-ol propanoato	5.58±1.63	1.84±0.37	<b>0.019</b>	1.28
68	Germacreno B	1.16±0.15	2.15±0.38	<b>0.014</b>	1.20
32	( <i>Z</i> )-3-Hexen-1-ol isobutirato	0.44±0.17	0.19±0.04	0.330	1.20
31	1,3,5-tris(metilen)- Cicloheptano	20.18±1.88	14.90±0.77	<b>0.032</b>	1.19
25	<i>p</i> -Menta-1,3,8-trieno	4.49±0.43	3.27±0.18	<b>0.011</b>	1.19
67	Biciclogermacreno	0.82±0.13	1.44±0.26	<b>0.050</b>	1.14
59	α-Cariofileno	55.21±7.21	89.75±12.04	<b>0.032</b>	1.13
2	3-Pentanol	16.14±2.47	10.15 ±1.18	<b>0.040</b>	1.13
62	Biciclosesquifelandreno	5.35±0.78	8.45±1.23	0.063	1.10
55	( <i>E</i> )-β-Cariofileno	113.14±14.98	175.36±22.78	<b>0.040</b>	1.09
50	δ-Elemeno	33.18±4.78	58.91±11.10	0.605	1.09
43	( <i>Z</i> )-3-Hexenil isovalerato	0.74±0.27	0.41±0.07	0.388	1.09
19	β-Terpineno	2.84±0.42	4.07±0.46	0.094	1.09
64	δ-Selineno	0.49±0.10	0.82±0.15	0.063	1.07
10	β-Pineno	8.06±0.49	10.87±1.02	<b>0.050</b>	1.07
46	Pipertona	1.81±0.21	1.32±0.07	0.113	1.04
13	2-Careno	3052.95±242.97	3608.83±143.17	0.114	1.04
63	β-Guaieno	0.46±0.10	0.82±0.18	0.094	1.03
66	Germacreno A	0.34±0.04	0.56±0.10	0.162	1.02
60	Isobiciclogermacreno	0.38±0.07	0.61±0.10	0.222	1.02
57	Guaia-6,9-dieno	1.34±0.20	1.91±0.27	0.094	1.01

**Tabla 4.4.** Compuestos volátiles detectados en el espacio aéreo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) *wild-type* inducidas con MeJA y crecidas bajo radiación natural y con suplementación de radiación RL. Los compuestos se encuentran ordenados de acuerdo a su contribución en la separación de los tratamientos.<sup>A</sup> Los números se correlacionan con los presentados en el *loading plot* de la Figuras 4.2, 4.3 y 4.4.<sup>B</sup> Mediciones cuantitativas de las emisiones de compuestos volátiles en plantas WT inducidas con MeJA crecidas bajo radiación natural, y con suplementación de radiación RL (WJ, WRLJ). Los valores se expresan como área promedio del pico ± error standard por gramo de tejido foliar fresco dividido por 10<sup>4</sup>. Las diferencias significativas entre tratamientos se observan con un *P*-valor en negrita (Mann-Whitney U test; *P*<0.05).<sup>C</sup> Valor VIP (Valores de la Importancia de la variable en la proyección) para el análisis de PLS-DA correspondiente a la figura 4.2. (*E,E*)-TMTT: (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno.

Cabe destacar que la inactivación del phyB empleando una aproximación fisiológica genera un re-arreglo en el patrón de abundancia de monoterpenos que es consistente con el efecto producido por la inactivación del phyB por mutación. En ambos casos la inactivación del phyB produjo una reducción en la emisión de *p*-menta-1,3,8-trieno, *trans*-3(10)-careen-2-ol y pulegon, y un aumento en las emisiones de  $\alpha$ -terpineno. Adicionalmente la inactivación del phyB por mutación o por adición de radiación RL produjo una reducción en las emisiones de (*E,E*)-TMTT (**Tabla 4.4**).

### 4.3.Discusión

En su entorno natural las plantas sufren un constante asedio por parte de un gran número de amenazas. Como respuesta frente al ataque, las plantas liberan un conjunto de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que le confieren un *bouquet* característico normalmente identificado con el tipo, mecanismo e individuo que propició el ataque (Bricchi *et al.*, 2010; Niinemets *et al.*, 2013). El *blend* de compuestos volátiles emitidos juega un papel importantísimo en la comunicación entre la planta y otros miembros del entorno, tales como herbívoros, plantas vecinas y enemigos naturales del herbívoro (Karban, 2008). Los VOCs tienen un rol sumamente importante en las defensas indirectas (Dicke, 2009; Hilker y Fatouros, 2015; Aljory y Chen, 2018), pero muy poco se sabe de la interconexión entre la detección de plantas vecinas mediadas por luz y la señalización a través de compuestos volátiles (Pierik *et al.*, 2014). Si bien existe evidencia del efecto producido por el sombreado sobre las defensas directas (Ballare, 2014), los efectos que tiene la calidad de luz sobre las defensas indirectas han recibido muy poca atención.

#### 4.3.1. La inactivación del phyB en tomate altera la composición del blend de compuestos volátiles emitidos.

Los VOCs juegan un papel importante en la ecología de las plantas. Tal es así que, para defenderse, reproducirse y diseminar su descendencia, las

plantas han evolucionado formas complejas para interactuar con su entorno, y los compuestos volátiles a menudo desempeñan papeles cruciales en estas interacciones. Las plantas pueden producir volátiles para disuadir a los herbívoros y atraer polinizadores, dispersores de semillas o enemigos carnívoros de herbívoros (Schoonhoven *et al.*, 2005; Dicke y Loreto, 2010; Bruce y Pickett, 2011). Por lo tanto, los volátiles emitidos por las plantas median interacciones planta-comunidad en el contexto de defensa y reproducción (Kessler *et al.*, 2006; Raguso, 2008; Dicke y Baldwin, 2010; Lucas-Barbosa *et al.*, 2011). La mayoría de los estudios sobre volátiles como mediadores de las interacciones con la comunidad se han desarrollado sobre la base de la respuesta de plantas aisladas. Sin embargo, las plantas no son individuos aislados, son miembros de comunidades de plantas e interactúan con sus pares vecinas. Si bien ya hemos descrito como la presencia de plantas vecinas altera el entorno lumínico y produce señales lumínicas asociadas a la competencia, poco sabemos de cómo esas señales (mayormente bajas R:RL) modulan la emisión de compuestos volátiles y las defensas indirectas. Tradicionalmente, las investigaciones llevadas a cabo sobre la respuesta de la planta a las distintas R:RL se han centrado en el estudio de los cambios morfológicos que permiten el crecimiento en altura de la planta y otras habilidades para subsistir en canopeos densos (Smith, 1995; Ballaré, 1999; Casal, 2012a; Pierik y de Wit, 2014; de Wit *et al.*, 2016), sin embargo hoy en día existe un mayor interés en encontrar el rol del fitocromo y otros fotorreceptores en los sistemas de defensa.

Trabajos recientes en la planta *Passiflora edulis* han mostrado como las bajas R:RL modulan las defensas indirectas a través de una disminución en la producción de néctar extra floral (Izaguirre *et al.*, 2013). Esta modulación negativa, al igual que en las defensas directas, es producida como resultado de una disminución de la sensibilidad al JA (Izaguirre *et al.*, 2013).

En este capítulo hemos demostrado que la inactivación del fitocromo B produce alteraciones en el blend de compuestos volátiles emitidos tanto en plantas control (**Figura 4.4 a, b; Tabla 4.2**) como cuando son inducidas con MeJA (**Figura 4.4 c, d; Tabla 4.3**). Cuando los cuatro tratamientos son sometidos a un análisis multivariado, en primera instancia se pudieron diferenciar dos grandes grupos, plantas control (WC y pC) y plantas tratadas con MeJA (WJ, pJ). Posteriormente en un análisis de a pares, se observó que en ambos

conjuntos de tratamientos (WC vs. pC y WJ vs. pJ) la inactivación del phyB produjo cambios en el patrón de compuestos volátiles emitidos. Los resultados obtenidos en este trabajo se correlacionan con trabajos previos realizados por otros grupos de investigación donde se estudió el efecto de las bajas relaciones R:RL sobre el perfil de compuestos volátiles emitidos por *Arabidopsis* en cámara de cultivo. Coincidentemente, Kegge *et al.* (2013) observó que la inactivación parcial del phyB por la suplementación con radiación RL reprimió la emisión de ciertos VOCs en plantas que previamente fueron tratadas con MeJA.

Estos resultados junto a los de Kegge *et al.* (2013) demuestran que la calidad de luz tiene un efecto modular sobre la emisión de compuestos volátiles con consecuencias potenciales sobre los distintos miembros del ecosistema. Si bien lo hasta aquí descrito es importante a la hora de saber cómo la calidad de luz modula la producción de VOCs y en consecuencia las defensas indirectas, todavía falta mucho por investigar acerca la inactivación del phyB regula colectivamente las distintas vías de producción de VOC.

#### **4.3.2. La foto-inactivación del phyB por radiación RL y la mutación de los genes PHYB producen similares efectos en el patrón de VOCs emitidos.**

Los VOCs juegan un rol importante en las defensas indirectas y la comunicación planta-planta (Heil y Karban, 2010; Ueda *et al.*, 2012; Hilker y Fatouros, 2015). De qué manera la emisión de VOCs se encuentra regulada por la intensidad de luz ha sido objeto de numerosas investigaciones (Takabayashi *et al.*, 1994; Halitschke *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2000; Gouinguene y Turlings, 2002). Sin embargo, la conexión entre las señales que denotan proximidad de plantas vecinas y la emisión de VOCs es algo que ha recibido poca atención (Pierik *et al.*, 2014). En este trabajo hemos demostrado que la inactivación del phyB por métodos genéticos (plantas *phyB1phyB2*) o la foto-inactivación, alterando la relación R:RL sin modificar el PAR, genera un patrón de VOCs similar, especialmente en la abundancia relativa de algunos monoterpenos. Hasta la fecha se han realizado numerosas investigaciones donde se comparan distintas aproximaciones para inactivar al phyB y su efecto sobre la acumulación de compuestos fenólicos, herbivoría y la economía del agua y del carbono

(Izaguirre *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2009; Boccalandro *et al.*, 2009), sin embargo en lo que respecta al análisis de VOCs en plantas de tomate bajo radiación natural es la primera vez que se tiene registro.

#### **4.4.Conclusión**

En este capítulo se demostró que la inactivación del phyB modula la emisión de VOCs en plantas de tomate crecidas bajo radiación natural. En plantas sanas se demostró que entre los genotipos WT y mutante de phyB los blends emitidos fueron significativamente diferentes y el 36% de los compuestos identificados fueron determinantes para la identidad de cada grupo. En la comparación realizada entre plantas donde se simuló herbivoría por medio de la aplicación de MeJA (WJ, pJ) se observaron diferencias significativas entre ambos blends, caracterizada por la mayor emisión de los terpenos 3,7,7-trimetil-1,3,5-cicloheptatrieno, pulegon, anetofuran, *trans*-3(10)-caren-2-ol, *p*-menta-1,3,8-trieno y (*E,E*)-TMTT en plantas WT; y  $\alpha$ -terpineno en plantas mutantes de phyB.

Se ha demostrado también que independientemente del *approach* utilizado para la inactivación del phyB, el blend de compuestos volátiles es similar.



## **Capítulo 5**

**Interacciones tritróficas. El efecto del fitocromo B (phyB) en la atracción de herbívoros y enemigos naturales.**

## Capítulo 5

### Interacciones tritróficas. El efecto del fitocromo B (phyB) en la atracción de herbívoros y enemigos naturales.

#### 5.1.Introducción

Algunas de las funciones centrales que permiten que las plantas sobrevivan y se reproduzcan dependen de mutualismos. Este tipo de interacciones involucra el intercambio de un bien o un servicio entre las especies que participan, a los que se denomina “socios mutualistas”. Por definición, cada especie que participa en un mutualismo recibe un beneficio, producto de la interacción, a un costo determinado que no siempre es equitativo para ambos socios (Bronstein, 1994). Este comportamiento no es altruista y cada especie persigue su beneficio propio, el que es consecuencia de la interacción entre socios. Diferentes tipos de organismos se ven involucrados en mutualismos, por lo tanto los beneficios y la metodología de intercambio empleada es altamente variable (Landry, 2012). La cooperación entre distintas especies se observa claramente durante la polinización, la dispersión de semillas y bajo tierra con la presencia de micorrizas asociadas a las raíces. De manera similar, las plantas superiores interactúan con animales del tercer nivel trófico, carnívoros y parasitoides, para obtener protección de los individuos del segundo nivel trófico, herbívoros y patógenos, a cambio de “casa y comida”.

Las plantas se comunican con un amplio rango de organismo presentes en el ambiente a través de compuestos volátiles. Ante el daño generado por un herbívoro, a través de la liberación de HIPVs la planta recluta a insectos carnívoros y parasitoides capaces de actuar en su defensa. Este fenómeno, conocido como “*cry for help*” (solicitar ayuda), fue descrito en primer lugar por Dicke *et al.* (1990b) y es claramente un ejemplo de mutualismo. Cada “socio mutualista” obtiene lo que necesita; la planta un batallón que la defienda, y el enemigo natural una gran cantidad de presas a disposición.

La composición e intensidad de los *blends* de VOCs emitidos refleja el *status* fisiológico y los estreses a los que la planta ha sido sometida en un determinado momento. La integración de los distintos factores ambientales, tanto



bióticos como abióticos, resultará en una química particular de la planta (Dudareva *et al.*, 2006). Distintos factores ambientales, como la intensidad de luz, concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico, temperatura, humedad relativa y disponibilidad de nutrientes pueden afectar la emisión de VOCs (Staudt y Bertin, 1998; Gershenzon *et al.*, 2000; Gouinguene y Turlings, 2002; Owen *et al.*, 2002b). En relación con la calidad de luz, trabajos recientes en *Arabidopsis* han demostrado que las bajas R:RL y el sombreado del canopeo afecta el blend de volátiles emitidos por plantas sanas e inducidas con MeJA (Kegge *et al.*, 2013). En el Capítulo 4 hemos descripto como los perfiles de VOCs emitidos por plantas de tomate en respuesta a la herbivoría se ven afectados por la calidad de luz del ambiente.

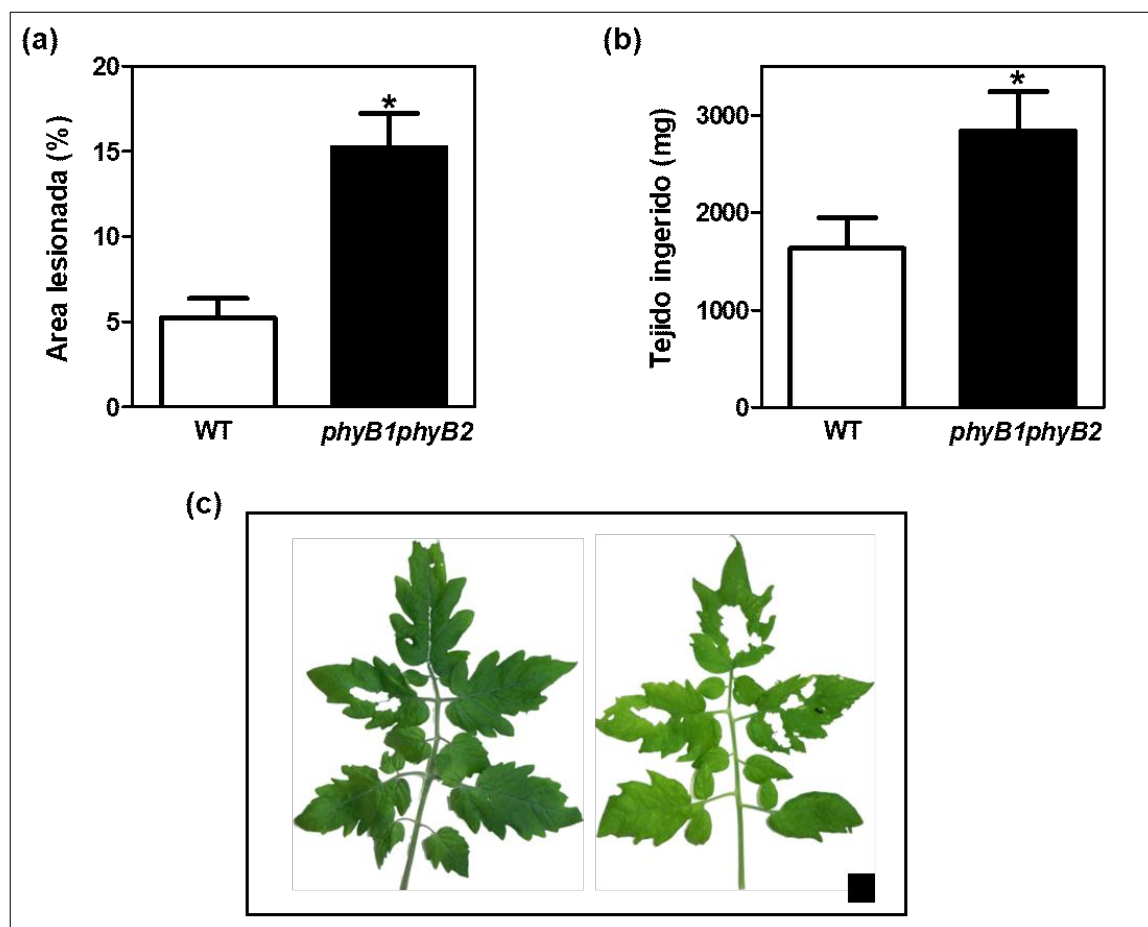
Teniendo en cuenta que estos compuestos son el lenguaje de comunicación entre la planta y sus guardaespaldas, es importante estudiar de qué manera los potenciales socios mutualistas interaccionan cuando el ambiente altera su medio de comunicación.

## 5.2. Resultados

### 5.2.1. En condiciones controladas, las plantas mutantes de phyB experimentan mayor tasa de herbivoría que sus pares WT

Con el fin de estudiar el efecto del phyB sobre la susceptibilidad a la herbivoría se realizó un ensayo de *no-choice* en el cual se cuantificó la tasa de herbivoría como el área porcentual consumida del total de la hoja, y la masa de tejido fresco ingerida por el herbívoro. Para tal fin, se colocó una larva de *M. brassicae* en estadio L5 sobre la tercera hoja de la planta y luego de 24 h se cuantificó el área consumida. Se observó que el daño producido en plantas mutantes de phyB fue tres veces más severo que en las plantas WT ( $15,24 \pm 2,00$  y  $5,22 \pm 1,25$  cm<sup>2</sup> respectivamente). En términos absolutos la masa de tejido foliar ingerido por las orugas de *M. brassicae* fue en las plantas mutantes de phyB un 75% mayor que en las plantas WT ( $1632,2 \pm 314,1$  y  $2838,4 \pm 402,7$  mg respectivamente) (**Figura 5.1**). Estos resultados son consistentes con otros experimentos donde se ha monitoreado la tasa de daño de distintos insectos con

diferentes mecanismos de alimentación (Izaguirre *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2009).



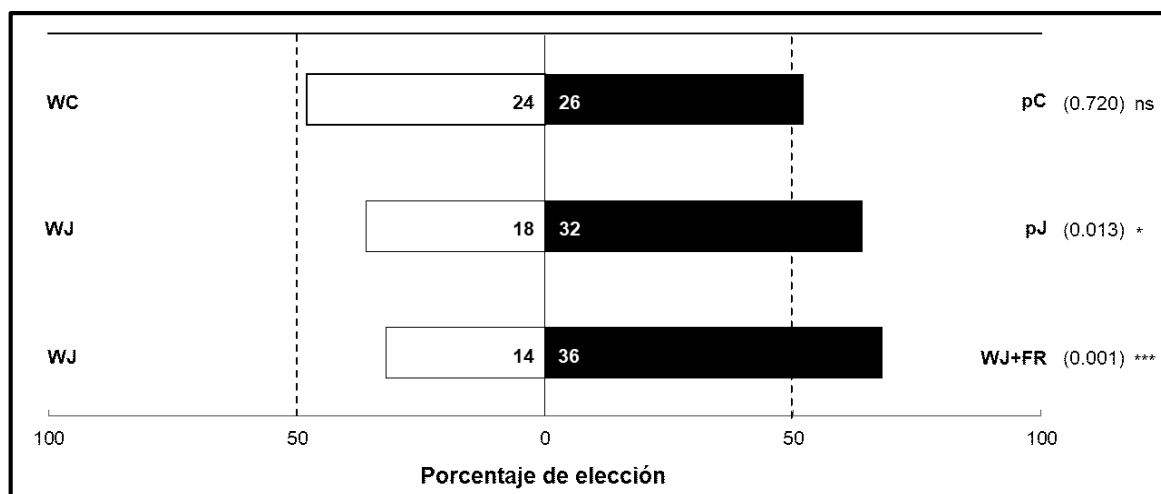
**Figura 5.1.** Efecto de la inactivación del phyB sobre la herbivoría en plantas de tomate. Cuantificación del daño producido en términos de (a) área lesionada y (b) tejido fresco ingerido por orugas de *Mamestra brassicae* (polilla del repollo) en estadio L5 sobre plantas WT y *phyB1phyB2* en un ensayo de *no-choice* realizado en un invernáculo bajo radiación natural. Las barras indican el daño porcentual de la hoja luego de 24 hs (n=9). Los asterisco denotan diferencias significativas entre las plantas WT y *phyB1phyB2* (*t-test* no apareado: \**P*-valor<0,03). (c) Fotografías que representan el daños en las hojas de plantas WT (izquierda) y *phyB1phyB2* (derecha) al final del ensayo (el cuadrado negro indica 5 cm<sup>2</sup>)

### 5.2.2. La inactivación del phyB en plantas inducidas con MeJA aumenta la atracción de enemigos naturales

Con la intención de investigar si las diferencias en la composición de VOCs emitidas pudiera tener un potencial rol en las defensas indirectas, se realizaron ensayos de *choice* en un olfatómetro en “Y” con la chinche predadora

*Macrolophus pygmaeus*. En este tipo de ensayo lo que se intenta determinar es si el insecto tiene preferencia por alguna de las dos plantas ofrecidas de acuerdo a los compuestos volátiles emitidos por estas. En primer lugar se observó que el dispositivo utilizado para este ensayo, el olfatómetro en Y, funcionó correctamente para el insecto, dado que el 94% de las hembras de *M. pygmaeus* mostraron una respuesta en su comportamiento. Teniendo en cuenta que este ensayo se realizó en días sucesivos, existía la posibilidad de que el factor día influyera sobre la respuesta del predador, en todos los tratamientos ensayados no se observó influencia alguna (GLM, modelos lineales generalizados,  $P > 0,05$ ). En total se realizaron tres ensayos de preferencia en los que se evaluó el comportamiento de 50 hembras de *M. pygmaeus* en cada uno. El primer ensayo se realizó comparando plantas control WT y *phyB1phyB2* (WC vs. pC), en el segundo se ofrecieron plantas WT y *phyB1phyB2* tratadas con MeJA (WJ vs. pJ) y en el tercero se utilizaron plantas WT tratadas con MeJA suplementadas con radiación rojo lejano y sin suplementar (WJ vs. WJRL).

Cuando las hembras de *Macrolophus pygmaeus* fueron expuestas a los blends emitidos por las plantas control WT y *phyB1phyB2*, no se observó preferencia por ninguna de las dos fuentes de volátiles ( $\chi^2=2,69$ ;  $df=1$ ;  $P=0,72$ ). En cambio, cuando la fuente de volátiles provino de plantas WT y *phyB1phyB2* tratadas con MeJA, las hembras de *M. pygmaeus* prefirieron a las plantas mutantes de *phyB* ( $\chi^2=10,44$ ;  $df=1$ ;  $P=0,013$ ). De manera similar a lo ocurrido anteriormente, cuando a los insectos se les dio a elegir entre los *blends* de volátiles de las plantas WT tratadas con MeJA cultivadas bajo radiación natural con o sin suplementación de RL, las hembras de *M. pygmaeus* tuvieron una clara predilección por los aromas emitidos por las plantas irradiadas con RL ( $\chi^2=6,25$ ;  $df=1$ ;  $P=0,001$ ) (**Figura 5.2**). Estos resultados muestran que el insecto no tiene una preferencia definida cuando lo que se le ofrece son plantas no inducidas, en cambio si las plantas son inducidas con MeJA, el predador muestra una significativa preferencia por los blends de volátiles emitidos por plantas donde el *phyB* se encuentra inactivo.



**Figura 5.2.** La inactivación del phyB en plantas inducidas con MeJA aumenta la atracción del predador *Macrolophus pygmaeus*. Las barras indican la respuesta en el comportamiento de las hembras *naïve* de *M. pygmaeus* dentro del olfatómetro en Y cuando fueron expuestas a los blends de volátiles emitidos por plantas con diferentes status de activación del phyB y tratamientos de MeJA. WC vs. pC indica la comparación entre plantas WT y *phyB1phyB2* crecidas bajo radiación natural sin tratamiento de MeJA; WJ vs. pJ indica la comparación entre plantas WT y *phyB1phyB2* crecidas bajo radiación natural y tratadas con MeJA (450  $\mu$ M); WJ vs. WJ+RL indica la comparación entre plantas WT crecidas bajo radiación natural y plantas WT suplementadas con luz RL, cuando ambos grupos fueron tratados con MeJA (450  $\mu$ M). Los asteriscos indican una preferencia significativamente diferente de una distribución 50:50 distribución dentro de un ensayo de *choice* (GLM: \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ ; ns no significativo). Los números en las barras indican el número de predadores que eligieron la respectiva fuente de compuestos volátiles.

### 5.3.Discusión

#### 5.3.1. La inactivación del phyB en plantas de tomate incrementa su susceptibilidad a la herbivoría.

En plantas intolerantes a la sombra, la calidad de luz es una señal determinante durante el crecimiento y desarrollo. La inactivación del phyB por bajas relaciones R:RL producto del sombreado de un canopeo, modula negativamente las defensas directas constitutivas e inducibles de la planta. La disminución del *cocktail* de metabolitos secundarios, sumado a una menor

densidad de tricomas y hojas más livianas, contribuyen a que el herbívoro tenga un mejor desempeño. Este hecho queda demostrado con los resultados obtenidos de tasa de herbivoría y de masa de tejido fresco ingerido. Estos resultados son consistentes con otros obtenidos en pepino y tomate con herbívoros con diferentes mecanismo de alimentación (McGuire y Agrawal, 2005; Izaguirre *et al.*, 2006).

### **5.3.2. El efecto del phyB sobre las emisiones de VOCs tienen implicancias en las interacciones tritróficas.**

Hasta donde se tiene conocimiento no existe evidencia previa sobre como las señales lumínicas que denotan competencia y/o sombreado modulan la atracción de enemigos naturales mediado por VOCs. Teniendo en cuenta este antecedente fue importante poder encontrar un predador capaz de responder a los *blends* de VOCs de tomate en las condiciones de estudio (inactivación de phyB y herbivoría). La elección de *Macrolophus pygmaeus* se debió a que existe evidencia de la alta respuesta que este predador tiene por los VOCs emitidos por plantas de tomate que se encuentran bajo el asedio de sus presas naturales (*Tuta absoluta* o *Bemisia tabaci*) (Lins *et al.*, 2014; De Backer *et al.*, 2015). En los bioensayos realizados con plantas inducidas con MeJA se observó una marcada preferencia por las plantas con el phyB inactivo (plantas *phyB1phyB2* o suplementadas con radiación RL). Si consideramos los resultados expuestos en el Capítulo 4 y los cotejamos con los bioensayos de elección del predador, podríamos sugerir que el efecto del phyB sobre los blends de VOCs de plantas inducidas con MeJA es funcionalmente importante en las interacciones tritróficas.

Podemos considerar que este tipo de respuesta es producto de la evolución, pero debemos ser cautos y tener en cuenta la presión de selección artificial a la que están sometidos estos cultivos durante su mejoramiento. Dicho esto, el efecto de la inactivación del phyB sobre los perfiles de VOCs parece tener un valor adaptativo entre los socios mutualistas. Para la planta la posibilidad de atraer a predadores y parasitoides, y parcialmente compensar el déficit de inversión en defensas directas, a expensas de un *switch* en el perfil de

VOCs ante un escenario de sombreado. Por su parte el predador al dirigir su búsqueda hacia plantas con *bouquets* propios de un escenario de sombreado y defensas atenuadas, incrementará las chances de encontrar presas más nutridas y en mayor abundancia. Es importante destacar que algunos predadores como *M. pygmaeus* son herbívoros facultativos (Castañé *et al.*, 2011), por lo tanto podría beneficiarse de los VOCs emitidos por plantas sombreadas con bajos niveles de defensa. Hasta el momento hemos mencionado solamente el intercambio defensa-alimento como un ejemplo de mutualismo, pero también podríamos pensar en defensa-refugio. La percepción de los VOCs emitidos por plantas sombreadas podría ser una señal de atracción para insectos que buscan refugiarse del exceso de radiación solar.

#### **5.4.Conclusión**

En este capítulo se demostró que la inactivación del phyB en plantas de tomate tiene implicancias directas sobre los niveles superiores de la cadena alimentaria. La modificación de rutas de señalización asociadas a las defensas como consecuencia de la inactivación del phyB produce alteraciones no solamente en la alimentación de los herbívoros sino también en el comportamiento de los insectos que se alimentan de éstos. Bajo condiciones de sombreado, donde el phyB se inactiva, se produce una disminución en la intensidad de señalización por la vía de los jasmonatos (Izaguirre *et al.*, 2013; Leone *et al.*, 2014; Chico *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2016), lo que provoca un debilitamiento de las defensas directas generando plantas más susceptibles a la herbivoría, hecho que se manifiesta en una mayor tasa de herbivoría e ingesta de tejido foliar. Es importante mencionar que este trabajo es pionero en dar evidencia sobre cómo la calidad de luz, particularmente el RL, modula las defensas indirectas y las consecuencias que estas tienen sobre la relación planta-predador. En este capítulo hemos demostrado que un predador muestra una significativa preferencia por los *blends* de VOCs provenientes de plantas que se encuentran en situación de sombreado y herbivoría.



# **Capítulo 6**

## **Conclusión general**



## 6.1. Conclusión general

Las plantas que crecen en altas densidades tienden a ser sombreadas por sus vecinas, lo cual genera un ambiente que las hace más vulnerables al ataque de insectos y patógenos. Como ya se mencionó previamente, este efecto presenta interés desde el punto de vista agronómico por disminuir las defensas de los cultivos sembrados a alta densidad. Tradicionalmente los estudios llevados a cabo para comprender las respuestas de las plantas a la radiación RL se focalizaron en aspectos morfológicos asociados a la altura y la habilidad para sobreponerse a ambientes sombreados con alta competencia (Smith, 1995; Ballaré, 1999; Boccalandro *et al.*, 2009; Casal, 2012a; Pierik y de Wit, 2014; de Wit *et al.*, 2016). En la actualidad el rol de los fitocromos y otros fotorreceptores en la regulación del sistema inmune vegetal ha despertado el interés de varios grupos de investigación (Ballaré *et al.*, 2012; Ballare, 2014; Smakowska *et al.*, 2016; Gommers, 2018).

Estudios en nuestro laboratorio, incluidos aquellos presentados en esta tesis, muestran que la regulación negativa de las defensas de las plantas que se encuentran en competencia lumínica con sus vecinas o bajo un riesgo inminente de competencia se correlaciona con una disminución en la sensibilidad de los tejidos a los jasmonatos (Moreno *et al.*, 2009; Cerrudo *et al.*, 2012; de Wit *et al.*, 2013; Leone *et al.*, 2014), y la consecuente atenuación de los sistemas de defensa (Ballare y Pierik, 2017). A partir de este panorama se ha propuesto analizar en profundidad los diferentes componentes del sistema de defensa de *Solanum lycopersicum* y su respuesta a situaciones de sombreado.

El objetivo general de esta tesis doctoral fue estudiar la respuesta del sistema inmune de *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de competencia conespecífica y las consecuencias en las interacciones con otros organismos de la cadena alimentaria.

En esta tesis se demuestra que la simulación de plantas vecinas mediante el suministro de radiación RL de manera lateral o bien a través de un *approach* genético, por mutación de los genes *PHYB*, reprime los sistemas de defensa directos constitutivos (defensas físicas y compuestos flavonoides). También se

demuestra que cuando se simula la presencia de un herbívoro a través del tratamiento con MeJA, los niveles de defensas inducibles se ven atenuadas en plantas con phyB inactivo. También se demuestra que la atenuación de los sistemas de defensa, producto de bajas relaciones R:RL, correlacionan con un aumento en la sensibilidad de plantas de tomate a la herbivoría por parte del *Mamestra brassicae*. Por otro lado, la tesis aporta evidencias en relación a los sistemas de defensa inducidos indirectos los que parcialmente podrían compensar a las defensas directas, a través de la atracción por HIPVs de enemigos naturales.

Como primer hipótesis de esta tesis se planteó que la inactivación del phyB desencadena el síndrome de escape al sombreado (SAS), y resulta en una atenuación de las defensas estructurales mediadas por tricomas y la esclerofilia. Existe evidencia que tanto la intensidad de luz y el fotoperiodo afectan directamente el desarrollo de tricomas (Chien y Sussex, 1996) como así también el espesor de la hoja (Pieruschka y Poorter, 2012). Se realizaron experimentos para probar a qué nivel la inactivación del phyB afecta el desarrollo de tricomas. En las plantas mutantes *phyB1phyB2* se observó una menor densidad de tricomas producto de una mayor expansión celular y la consecuente dilución de los tricomas. Estos resultados fueron consecuentes con los observados por Boccalandro *et al.* (2009) en donde phyB modula la diferenciación y tamaño de células epidérmicas. En los ensayos realizados con plantas WT, *phyB1phyB2* y WT irradiadas con RL lateral, se observó un fuerte fenotipo SAS, además de una menor LMA en aquellas plantas con phyB inactivo. Sobre la base de estos resultados se aceptó la hipótesis de que la inactivación del phyB modula negativamente las defensas estructurales.

La segunda hipótesis a poner a prueba fue que las plantas cultivadas con bajas relaciones R:RL presentan un disminuido nivel de defensas químicas y una baja inducción de las mismas ante el ataque de un herbívoro. Existe evidencia de que los fitocromos y la luz están involucrados en la síntesis y metabolismo de compuestos fenólicos (Mancinelli *et al.*, 1991; Beggs y Wellmann, 1994). En los experimentos realizados se observó una reducción en la concentración de compuestos fenólicos C<sub>15</sub>. Estos resultados son consecuentes con los observados en otras especies (Mazza y Ballare, 2015). En relación a la producción de compuestos terpénicos, se encontró que la inactivación del phyB

produjo diferentes patrones dentro del tejido foliar. Estas observaciones fueron importantes para indagar en profundidad el comportamiento de estos compuestos en el espacio aéreo de la planta. Además del efecto sobre el perfil de compuestos fenólicos y terpénicos, se demostró que la inactivación del phyB produce una fuerte represión sobre genes marcadores del JA. Se observó una fuerte represión de los genes *PIN-II* y *TD*, *LOXD* y *LOXA*. Estos genes codifican para proteínas involucrados en las defensas directas y la biosíntesis de MeJA (Ryan, 1990; Beaudoin y Rothstein, 1997; Heitz *et al.*, 1997; Griffiths *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2013a). En cambio la expresión del gen *PPO*, no se vio afectada por la inactivación del phyB. Estos resultados fueron consecuentes con lo observado en *Arabidopsis* (Moreno *et al.*, 2009; Robson *et al.*, 2010; de Wit *et al.*, 2013) y arroz (Xie *et al.*, 2011). En conjunto estos resultados demuestran que la inactivación del phyB por señales de competencia produce una atenuación en los sistemas de defensa ante el ataque de un herbívoro. Sobre la base de los resultados expuestos podríamos aceptar parcialmente esta hipótesis.

La tercer hipótesis planteada fue que la inactivación del phyB en plantas de tomate inducidas con MeJA, altera el *blend* de VOCs emitidos. Los VOCs juegan un papel muy importante en las defensas indirectas. A pesar de los numerosos trabajos que dan evidencia de la relación entre la emisión de VOCs y la intensidad lumínica (Schuh *et al.*, 1997; Owen *et al.*, 2002a; Holopainen y Gershenzon, 2010), muy poco se ha indagado sobre el efecto que produce la calidad de luz, en especial los cambios en el espectro relacionados con la detección de plantas vecinas (Pierik *et al.*, 2014). En esta tesis hemos demostrado que la inactivación del phyB en plantas donde se simuló herbivoría por aplicación de MeJA, genera cambios en el patrón de emisión de VOCs comparado con plantas control. A su vez, se comprobó que independientemente del método utilizado para inactivar el phyB (fotoinactivación por suplementación con radiación RL o mutación de los genes *PHYB*), los patrones de emisión se conservaron. Esta tesis aporta evidencias experimentales que permiten afirmar que las señales de competencia detectadas por el phyB producen cambios en los patrones de emisión de los VOCs, alterando el *bouquet* característico de la planta. En base a estos resultados aceptamos la hipótesis.

La última hipótesis que se planteó en esta tesis fue que la inactivación del phyB produce un *switch* de defensas directas hacia indirectas. Ante un evento de herbivoría, en plantas cuyo phyB se encuentra inactivado por bajas relaciones R:RL, la emisión de VOCs podría atraer a enemigos naturales a que las defiendan. Hasta el día de hoy no se registran antecedentes de cómo señales de luz que denotan competencia pueden modular la atracción de enemigos naturales mediados por VOCs. En los ensayos realizados con el mirido *M. pygmaeus*, se observó una preferencia significativa por los *blends* de VOCs emitidos por plantas donde se simuló herbivoría y que tenían el phyB inactivo por mutación o por suplementación con radiación RL. Estos resultados, en conjunto con los descritos en la aceptación de la tercera hipótesis, sugieren que el perfil de VOCs emitido por plantas expuestas a condiciones de sombreado y herbivoría, tienen implicancias importantes para entender la comunicación de las plantas con niveles tróficos superiores. Frente a la atenuación de las defensas de la planta, asociada al dilema entre crecer y defenderse, este mecanismo alternativo le permite “*cry for help*” (“solicitar ayuda”) (Dicke *et al.*, 1990a) y atraer a enemigos naturales que pueden proveer una defensa indirecta. Esta tesis hace un aporte sustancial al demostrar que en plantas que experimentan un ambiente lumínico que simula el efecto de la proximidad de plantas vecinas, la inducción de sus defensas por el ataque de un herbívoro promueve un sistema de defensa indirecto que le permite atraer a enemigos naturales. En base a estos resultados aceptamos la hipótesis.

Los resultados y conclusiones expuestos en esta tesis no solo proveen evidencia sobre el intenso *crosstalk* entre señales lumínicas y señales químicas asociadas a la defensa, sino que proveen información sobre como el *status* del phyB puede afectar la emisión de VOCs, los que funcionan como fuente de comunicación para un amplio rango de organismos. Podemos decir que los cambios fenotípicos que se producen en respuesta a las variaciones en la relación R:RL tienen consecuencias que van más allá de los cambios morfológicos que la planta pueda realizar. Los resultados sugieren una serie de interacciones complejas, en donde las plantas no solamente adaptan su morfología a los cambios del ambiente lumínico, sino que también modifican la química de su espacio aéreo de una manera que es atractiva para los enemigos naturales y herbívoros.

Comprender estas redes de comunicación reviste un fuerte interés y tiene implicancias prácticas sustanciales en el campo de la agricultura. Una mejor comprensión de cómo estos mecanismos de defensa son regulados en condiciones naturales, tanto por factores de estrés abiótico como por factores bióticos, aportará elementos de valor para diseñar aproximaciones biotecnológicas destinadas a tolerar mayores densidades de cultivo, más resistentes y de este modo un mayor rinde minimizando el impacto ambiental por el uso de agroquímicos.



# **Capítulo 7**

## **Bibliografía**

**Capítulo 7**  
**Bibliografía**

## 7.1. Bibliografía

**Aartsma, Y., Bianchi, F., van der Werf, W., Poelman, E.H., Dicke, M., 2017.** Herbivore-induced plant volatiles and tritrophic interactions across spatial scales. *New Phytol* **216**, 1054-1063.

**Agrawal, A.A., 1999.** Induced responses to herbivory in wild radish: Effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology* **80**, 1713-1723.

**Agrawal, A.A., 2000.** Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 329-335.

**Agrawal, A.A., 2004.** Plant defense and density dependence in the population growth of herbivores. *Am Nat* **164**, 113-120.

**Agrawal, A.A., 2011.** Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Functional Ecology* **25**, 420-432.

**Agrawal, A.A., Fishbein, M., Halitschke, R., Hastings, A.P., Rabosky, D.L., Rasmann, S., 2009.** Evidence for adaptive radiation from a phylogenetic study of plant defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18067-18072.

**Agrawal, A.A., Kearney, E.E., Hastings, A.P., Ramsey, T.E., 2012.** Attenuation of the jasmonate burst, plant defensive traits, and resistance to specialist monarch caterpillars on shaded common milkweed (*Asclepias syriaca*). *J Chem Ecol* **38**, 893-901.

**Alba, J.M., Montserrat, M., Fernandez-Munoz, R., 2009.** Resistance to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) by acylsucroses of wild tomato (*Solanum pimpinellifolium*) trichomes studied in a recombinant inbred line population. *Exp Appl Acarol* **47**, 35-47.



- Alba, R., Kelmenson, P.M., Cordonnier-Pratt, M.M., Pratt, L.H.**, 2000. The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms. *Mol Biol Evol* **17**, 362-373.
- Alborn, H., Turlings, T., Jones, T., Stenhagen, G., Loughrin, J., Tumlinson, J.**, 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* **276**, 945-949.
- Aljory, Z., Chen, M.S.**, 2018. Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science* **25**, 2-23.
- Appel, H.M.**, 1993. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. *J Chem Ecol* **19**, 1521-1552.
- Appel, H.M., Cocroft, R.B.**, 2014. Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing. *Oecologia* **175**, 1257-1266.
- Arimura, G., Kost, C., Boland, W.**, 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim Biophys Acta* **1734**, 91-111.
- Arimura, G., Ozawa, R., Kugimiya, S., Takabayashi, J., Bohlmann, J.**, 2004. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-beta-ocimene and transcript accumulation of (E)-beta-ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **135**, 1976-1983.
- Baldwin, I.T., Schultz, J.C.**, 1983. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science* **221**, 277-279.
- Ballare, C.L.**, 2009. Illuminated behaviour: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. *Plant Cell Environ* **32**, 713-725.

- Ballare, C.L.**, 2011. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends Plant Sci* **16**, 249-257.
- Ballare, C.L.**, 2014. Light regulation of plant defense. *Annu Rev Plant Biol* **65**, 335-363.
- Ballaré, C.L.**, 1999. Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends Plant Sci* **4**, 97-102.
- Ballaré, C.L., Mazza, C.A., Austin, A.T., Pierik, R.**, 2012. Canopy light and plant health. *Plant Physiology* **160**, 145-155.
- Ballare, C.L., Pierik, R.**, 2017. The shade-avoidance syndrome: multiple signals and ecological consequences. *Plant Cell Environ.*
- Ballare, C.L., Scopel, A.L., Sanchez, R.A.**, 1990. Far-red radiation reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. *Science* **247**, 329-332.
- Barbehenn, R.V., Constabel, C.P.**, 2011. Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* **72**, 1551-1565.
- Beaudoin, N., Rothstein, S.J.**, 1997. Developmental regulation of two tomato lipoxygenase promoters in transgenic tobacco and tomato. *Plant Molecular Biology* **33**, 835-846.
- Beggs, C.J., Wellmann, E.**, 1994. Photocontrol of flavonoid biosynthesis. In: Kendrick R.E., Kronenberg G.H.M. (eds) *Photomorphogenesis in Plants*. Springer, Dordrecht

**Boccalandro, H.E., Rugnone, M.L., Moreno, J.E., Ploschuk, E.L., Serna, L., Yanovsky, M.J., Casal, J.J.,** 2009. Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **150**, 1083-1092.

**Bonaventure, G.,** 2012. Perception of insect feeding by plants. *Plant Biol* (Stuttg) **14**, 872-880.

**Boughton, A.J., Hoover, K., Felton, G.W.,** 2005. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J Chem Ecol* **31**, 2211-2216.

**Bozorov, T.A., Dinh, S.T., Baldwin, I.T.,** 2017. JA but not JA-Ile is the cell-nonautonomous signal activating JA mediated systemic defenses to herbivory in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Integrative Plant Biology*.

**Bricchi, I., Leitner, M., Foti, M., Mithöfer, A., Boland, W., Maffei, M.,** 2010. Robotic mechanical wounding (MecWorm) versus herbivore-induced responses: Early signaling and volatile emission in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.).

**Briggs, W.R., Christie, J.M.,** 2002. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **7**, 204-210.

**Bronstein, J.L.,** 1994. Our current understanding of mutualism. *The Quarterly Review of Biology* **69**, 31-51.

**Bruce, T.J., Pickett, J.A.,** 2011. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects--finding the right mix. *Phytochemistry* **72**, 1605-1611.

**Bruinsma, M., Dicke, M.**, 2008. Herbivore-Induced Indirect Defense: From Induction Mechanisms to Community Ecology, In: Schaller, A. (Ed.), Induced Plant Resistance to Herbivory. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 31-60.

**Cagnola, J.I., Ploschuk, E., Benech-Arnold, T., Finlayson, S.A., Casal, J.J.**, 2012. Stem transcriptome reveals mechanisms to reduce the energetic cost of shade-avoidance responses in tomato. *Plant Physiol* **160**, 1110-1119.

**Caldwell, E., Read, J., Sanson, G.D.**, 2016. Which leaf mechanical traits correlate with insect herbivory among feeding guilds? *Annals of Botany* **117**, 349-361.

**Campos, M.L., de Almeida, M., Rossi, M.L., Martinelli, A.P., Litholdo Junior, C.G., Figueira, A., Rampelotti-Ferreira, F.T., Vendramim, J.D., Benedito, V.A., Pereira Peres, L.E.**, 2009. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4347-4361.

**Campos, M.L., Yoshida, Y., Major, I.T., de Oliveira Ferreira, D., Weraduwege, S.M., Froehlich, J.E., Johnson, B.F., Kramer, D.M., Jander, G., Sharkey, T.D., Howe, G.A.**, 2016. Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nature Communications* **7**, 12570.

**Casal, J.J.**, 2012a. Shade Avoidance. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **10**, e0157.

**Casal, J.J.**, 2012b. Shade avoidance. *Arabidopsis Book* **10**, e0157.

**Casson, S.A., Hetherington, A.M.**, 2014. phytochrome B Is required for light-mediated systemic control of stomatal development. *Curr Biol* **24**, 1216-1221.

**Castañé, C., Arnó, J., Gabarra, R., Alomar, O.,** 2011. Plant damage to vegetable crops by zoophytophagous mirid predators. *Biological control* **59**, 22-29.

**Catola, S., Centritto, M., Cascone, P., Ranieri, A., Loreto, F., Calamai, L., Balestrini, R., Guerrieri, E.,** 2018. Effects of single or combined water deficit and aphid attack on tomato volatile organic compound (VOC) emission and plant-plant communication. *Environmental and Experimental Botany* **153**, 54-62.

**Cerrudo, I., Caliri-Ortiz, M.E., Keller, M.M., Degano, M.E., Demkura, P.V., Ballare, C.L.,** 2017. Exploring growth-defence trade-offs in Arabidopsis: phytochrome B inactivation requires JAZ10 to suppress plant immunity but not to trigger shade-avoidance responses. *Plant Cell Environ* **40**, 635-644.

**Cerrudo, I., Keller, M.M., Cargnel, M.D., Demkura, P.V., de Wit, M., Patitucci, M.S., Pierik, R., Pieterse, C.M., Ballare, C.L.,** 2012. Low red/far-red ratios reduce Arabidopsis resistance to *Botrytis cinerea* and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. *Plant Physiol* **158**, 2042-2052.

**Cipollini, M.L., Paulk, E., Mink, K., Vaughn, K., Fischer, T.,** 2004. Defense tradeoffs in fleshy fruits: effects of resource variation on growth, reproduction, and fruit secondary chemistry in *Solanum carolinense*. *J Chem Ecol* **30**, 1-17.

**Coneva, V., Frank, M.H., Balaguer, M.A.d.L., Li, M., Sozzani, R., Chitwood, D.H.,** 2017. Genetic Architecture and Molecular Networks Underlying Leaf Thickness in Desert-Adapted Tomato, *Solanum pennellii*. *Plant Physiology* **175**, 376-391.

**Constabel, C.P., Bergey, D.R., Ryan, C.A.,** 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 407-411.

**Cortes, L.E., Weldegergis, B.T., Boccalandro, H.E., Dicke, M., Ballare, C.L.,** 2016. Trading direct for indirect defense? Phytochrome B inactivation in tomato attenuates direct anti-herbivore defenses whilst enhancing volatile-mediated attraction of predators. *New Phytol* **212**, 1057-1071.

**Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z., Grierson, D.,** 2004. Identification of a Specific Isoform of Tomato Lipoxygenase (TomloxC) Involved in the Generation of Fatty Acid-Derived Flavor Compounds. *Plant Physiology* **136**, 2641-2651.

**Chen, H., Wilkerson, C.G., Kuchar, J.A., Phinney, B.S., Howe, G.A.,** 2005. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 19237-19242.

**Chico, J.M., Fernandez-Barbero, G., Chini, A., Fernandez-Calvo, P., Diez-Diaz, M., Solano, R.,** 2014. Repression of Jasmonate-Dependent Defenses by Shade Involves Differential Regulation of Protein Stability of MYC Transcription Factors and Their JAZ Repressors in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**, 1967-1980.

**Chien, J.C., Sussex, I.M.,** 1996. Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* **111**, 1321-1328.

**Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., Solano, R.,** 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-671.

**Choong, M.F.,** 1996. What makes a leaf tough and how this affects the pattern of *Castanopsis fissa* leaf consumption by caterpillars. *Functional Ecology*, 668-674.

**Choong, M.F., Lucas, P.W., Ong, J.S.Y., Pereira, B., Tan, H.T.W., Turner, I.M.,** 1992. Leaf fracture toughness and sclerophylly: their correlations and ecological implications. *New Phytologist* **121**, 597-610.

**De Backer, L., Megido, R.C., Fauconnier, M.-L., Brostaux, Y., Francis, F., Verheggen, F.,** 2015. *Tuta absoluta*-induced plant volatiles: attractiveness towards the generalist predator *Macrolophus pygmaeus*. *Arthropod-Plant Interactions* **9**, 465-476.

**De Boer, J., Snoeren, T., Dicke, M.,** 2005. Predatory mites learn to discriminate between plant volatiles induced by prey and nonprey herbivores. *Animal Behaviour* **69**, 869-879.

**de Jong, G.,** 2005. Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytol* **166**, 101-117.

**de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E., Prat, S.,** 2008. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**, 480-484.

**de Wit, M., Keuskamp, D.H., Bongers, F.J., Hornitschek, P., Gommers, C.M.M., Reinen, E., Martínez-Cerón, C., Fankhauser, C., Pierik, R.,** 2016. Integration of Phytochrome and Cryptochrome Signals Determines Plant Growth during Competition for Light. *Current Biology* **26**, 3320-3326.

**de Wit, M., Spoel, S.H., Sanchez-Perez, G.F., Gommers, C.M.M., Pieterse, C.M.J., Voosenek, L.A.C.J., Pierik, R.,** 2013. Perception of low red:far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **75**, 90-103.

**Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.,** 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

**Dicke, M.,** 2009. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant Cell Environ* **32**, 654-665.

**Dicke, M., Baldwin, I.T.,** 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends Plant Sci* **15**, 167-175.

**Dicke, M., Loreto, F.,** 2010. Induced plant volatiles: from genes to climate change. *Trends Plant Sci* **15**, 115-117.

**Dicke, M., Sabelis, M.,** 1988a. How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands journal of Zoology* **38**, 148-165.

**Dicke, M., Sabelis, M.,** 1988b. How Plants Obtain Predatory Mites as Bodyguards.

**Dicke, M., Sabelis, M., Takabayshi, J.,** 1990a. Do plants cry for help?

**Dicke, M., Sabelis, M.W., Takabayashi, J., Bruin, J., Posthumus, M.A.,** 1990b. Plant strategies of manipulating predatorprey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. *J Chem Ecol* **16**, 3091-3118.

**Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A., Orlova, I.,** 2006. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 417-440.

**Dudareva, N., Pichersky, E.,** 2000. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol* **122**, 627-633.



- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J.**, 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* **135**, 1893-1902.
- Duffey, S.S., Stout, M.J.**, 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of insect biochemistry and physiology* **32**, 3-37.
- Elliger, C.A., Wong, Y., Chan, B.G., Waiss, A.C., Jr.**, 1981. Growth inhibitors in tomato (*Lycopersicon*) to tomato fruitworm (*Heliothis zea*). *J Chem Ecol* **7**, 753-758.
- Erb, M., Meldau, S., Howe, G.A.**, 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci* **17**, 250-259.
- Escobar-Bravo, R., Klinkhamer, P.G.L., Leiss, K.A.**, 2017. Interactive Effects of UV-B Light with Abiotic Factors on Plant Growth and Chemistry, and Their Consequences for Defense against Arthropod Herbivores. *Front Plant Sci* **8**.
- Exposito-Rodriguez, M., Borges, A.A., Borges-Perez, A., Perez, J.A.**, 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* **8**, 131.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schafer, E., Fu, X., Fan, L.M., Deng, X.W.**, 2008. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**, 475-479.
- Feussner, I., Wasternack, C.**, 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 275-297.
- Firn, R.**, 2004. Plant intelligence: an alternative point of view. *Ann Bot* **93**, 345-351.

**Fischbach, R.J., Zimmer, W., Schnitzler, J.P.**, 2001. Isolation and functional analysis of a cDNA encoding a myrcene synthase from holm oak (*Quercus ilex* L.). Eur J Biochem **268**, 5633-5638.

**Fonseca, S., Chico, J.M., Solano, R.**, 2009. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. Curr Opin Plant Biol **12**, 539-547.

**Forsyth, D.M., Richardson, S.J., Menchenton, K.**, 2005. Foliar fibre predicts diet selection by invasive Red Deer Cervus (*Elaphus scoticus*) in a temperate New Zealand forest. Functional Ecology **19**, 495-504.

**Fraenkel, G.S.**, 1959. The raison d'etre of secondary plant substances; these odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. Science **129**, 1466-1470.

**Franklin, K.A.**, 2008. Shade avoidance. New Phytol **179**, 930-944.

**Fujimoto, T., Tomitaka, Y., Abe, H., Tsuda, S., Futai, K., Mizukubo, T.**, 2011. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. J Plant Physiol **168**, 1084-1097.

**Gang, D.R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K.H., Simon, J.E., Lewinsohn, E., Pichersky, E.**, 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. Plant Physiol **125**, 539-555.

**Gershenzon, J., McConkey, M.E., Croteau, R.B.**, 2000. Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint. Plant Physiology **122**, 205.

- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., Farmer, E.E.**, 2010. Jasmonate biochemical pathway. *Sci Signal* **3**.
- Goffreda, J.C., Mutschler, M.A., Ave, D.A., Tingey, W.M., Steffens, J.C.**, 1989. Aphid deterrence by glucose esters in glandular trichome exudate of the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*. *J Chem Ecol* **15**, 2135-2147.
- Gommers, C.M.M.**, 2018. The Healing Power of Light. *Plant Physiology* **178**, 9-10.
- Gouinguene, S.P., Turlings, T.C.**, 2002. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol* **129**, 1296-1307.
- Green, T.R., Ryan, C.A.**, 1972. Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects. *Science* **175**, 776-777.
- Griffiths, A., Barry, C., Alpuche-Solis, A.G., Grierson, D.**, 1999. Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *J Exp Bot* **50**, 793-798.
- Grubb, P.J.**, 1986. Sclerophylls, pachyphylls and pycnophylls: the nature and significance of hard surfaces. In: Juniper, B., Southwood, T.R.E. (Eds.), *Insects and the Plant Surface*. Arnold, London, 137–150.
- Haberlandt, G.**, 1914. Hermann Sommerstorff. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **32**, 86-88.
- Halitschke, R., Keßler, A., Kahl, J., Lorenz, A., Baldwin, I.T.**, 2000. Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* **124**, 408-417.

**Hall, D.E., MacGregor, K.B., Nijse, J., Bown, A.W.**, 2004. Footsteps from insect larvae damage leaf surfaces and initiate rapid responses. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 441-447.

**Handley, R., Ekbom, B., Ågren, J.**, 2005. Variation in trichome density and resistance against a specialist insect herbivore in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Ecological Entomology* **30**, 284-292.

**Hanley, M.E., Lamont, B.B., Fairbanks, M.M., Rafferty, C.M.**, 2007. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **8**, 157-178.

**Hare, J.D.**, 2011. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annu Rev Entomol* **56**, 161-180.

**Heidel, A.J., Baldwin, I.T.**, 2004. Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid-signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. *Plant, Cell & Environment* **27**, 1362-1373.

**Heil, M.**, 2008a. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* **178**, 41-61.

**Heil, M.**, 2008b. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol* **178**, 41-61.

**Heil, M.**, 2014. Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. *New Phytologist* **204**, 297-306.

**Heil, M., Ibarra-Laclette, E., Adame-Alvarez, R.M., Martinez, O., Ramirez-Chavez, E., Molina-Torres, J., Herrera-Estrella, L.**, 2012. How plants sense wounds: damaged-self recognition is based on plant-derived elicitors and induces octadecanoid signaling. *PLoS One* **7**, e30537.

**Heil, M., Karban, R.**, 2010. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends Ecol Evol* **25**, 137-144.

**Heitz, T., Bergey, D.R., Ryan, C.A.**, 1997. A Gene Encoding a Chloroplast-Targeted Lipoxygenase in Tomato Leaves Is Transiently Induced by Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *Plant Physiology* **114**, 1085-1093.

**Helsper, J.P.F.G., Davies, J.A., Bouwmeester, H.J., Krol, A.F., van Kampen, M.H.**, 1998. Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa hybrida* L. cv. Honesty. *Planta* **207**, 88-95.

**Herms, D.A., Mattson, W.J.**, 1992. The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**, 283-335.

**Hilker, M., Fatouros, N.E.**, 2015. Plant responses to insect egg deposition. *Annual Review of Entomology* **60**, 493-515.

**Hilker, M., Meiners, T.**, 2006. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. *J Chem Ecol* **32**, 1379-1397.

**Hoballah, M.E.F., Tamò, C., Turlings, T.C.J.**, 2002. Differential Attractiveness of Induced Odors Emitted by Eight Maize Varieties for the Parasitoid *Cotesia marginiventris*: Is Quality or Quantity Important? *Journal of Chemical Ecology* **28**, 951-968.

**Holeski, L.M.**, 2007. Within and between generation phenotypic plasticity in trichome density of *Mimulus guttatus*. *J Evol Biol* **20**, 2092-2100.

**Holmes, M.G., Smith, H.**, 1977. The function of Phytochrome in natural environment—II. The influence of vegetation canopies on the spectral energy distribution of natural daylight. *Photochemistry and Photobiology* **25**, 539-545.

- Holopainen, J.K., Gershenzon, J.**, 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci* **15**, 176-184.
- Holopainen, J.K., Kivimaenpaa, M., Julkunen-Tiitto, R.**, 2018. New Light for Phytochemicals. *Trends Biotechnol* **36**, 7-10.
- Howe, G.A.**, 2010. Ubiquitin ligase-coupled receptors extend their reach to jasmonate. *Plant Physiol* **154**, 471-474.
- Howe, G.A., Jander, G.**, 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 41-66.
- Izaguirre, M.M., Mazza, C.A., Astigueta, M.S., Ciarla, A.M., Ballare, C.L.**, 2013. No time for candy: passionfruit (*Passiflora edulis*) plants down-regulate damage-induced extra floral nectar production in response to light signals of competition. *Oecologia* **173**, 213-221.
- Izaguirre, M.M., Mazza, C.A., Biondini, M., Baldwin, I.T., Ballare, C.L.**, 2006. Remote sensing of future competitors: impacts on plant defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7170-7174.
- Izaguirre, M.M., Scopel, A.L., Baldwin, I.T., Ballare, C.L.**, 2003. Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiol* **132**, 1755-1767.
- Jackson, M.B., Ishizawa, K., Ito, O.**, 2009. Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Ann Bot* **103**, 137-142.
- Jetter, R.**, 2006. Examination of the Processes Involved in the Emission of Scent Volatiles from Flowers.

**Jones, J.D., Dangl, J.L.**, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.

**Jones, P., Vogt, T.**, 2001. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**, 164-174.

**Joo, Y., Schuman, M.C., Goldberg, J.K., Kim, S.G., Yon, F., Brütting, C., Baldwin, I.T., Rasmann, S.**, 2018. Herbivore-induced volatile blends with both “fast” and “slow” components provide robust indirect defence in nature. *Functional Ecology* **32**, 136-149.

**Kang, J.H., Liu, G., Shi, F., Jones, A.D., Beaudry, R.M., Howe, G.A.**, 2010a. The tomato odorless-2 mutant is defective in trichome-based production of diverse specialized metabolites and broad-spectrum resistance to insect herbivores. *Plant Physiol* **154**, 262-272.

**Kang, J.H., Shi, F., Jones, A.D., Marks, M.D., Howe, G.A.**, 2010b. Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *J Exp Bot* **61**, 1053-1064.

**Karban, R.**, 2008. Plant behaviour and communication. *Ecol Lett* **11**, 727-739.

**Karban, R., Baldwin, I.T.**, 1997. Induced responses to herbivory. University of Chicago Press, Chicago.

**Kazan, K., Manners, J.M.**, 2012. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**, 22-31.

**Kegge, W., Ninkovic, V., Glinwood, R., Welschen, R.A., Voeselek, L.A., Pierik, R.**, 2015. Red:far-red light conditions affect the emission of volatile organic compounds from barley (*Hordeum vulgare*), leading to altered biomass allocation in neighbouring plants. *Ann Bot* **115**, 961-970.

**Kegge, W., Pierik, R.**, 2010. Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends Plant Sci* **15**, 126-132.

**Kegge, W., Weldegergis, B.T., Soler, R., Vergeer-Van Eijk, M., Dicke, M., Voesenek, L.A., Pierik, R.**, 2013. Canopy light cues affect emission of constitutive and methyl jasmonate-induced volatile organic compounds in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **200**, 861-874.

**Keinanen, M., Oldham, N.J., Baldwin, I.T.**, 2001. Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *J Agric Food Chem* **49**, 3553-3558.

**Kennedy, G.G.**, 2003. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annu Rev Entomol* **48**, 51-72.

**Kessler, A., Baldwin, I.T.**, 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**, 2141-2144.

**Kessler, A., Halitschke, R., Diezel, C., Baldwin, I.T.**, 2006. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* **148**, 280-292.

**Keuskamp, D.H., Sasidharan, R., Pierik, R.**, 2010. Physiological regulation and functional significance of shade avoidance responses to neighbors. *Plant Signal Behav* **5**, 655-662.

**Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C.M., Dudareva, N.**, 2001. Regulation of Circadian Methyl Benzoate Emission in Diurnally and Nocturnally Emitting Plants. *The Plant Cell* **13**, 2333-2348.



**Koo, A.J., Gao, X., Daniel Jones, A., Howe, G.A.,** 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in Arabidopsis. The Plant Journal **59**, 974-986.

**Koo, A.J.K., Howe, G.A.,** 2012. Catabolism and Deactivation of the Lipid-Derived Hormone Jasmonoyl-Isoleucine. Front Plant Sci **3**.

**Kourtchenko, O., Andersson, M.X., Hamberg, M., Brunnstrom, A., Gobel, C., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Feussner, I., Ellerstrom, M.,** 2007. Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: jasmonate signaling dependence. Plant Physiol **145**, 1658-1669.

**Kramell, R., Schmidt, J., Herrmann, G., Schliemann, W.,** 2005. N-(jasmonoyl)tyrosine-derived compounds from flowers of broad beans (*Vicia faba*). J Nat Prod **68**, 1345-1349.

**Landry, C.,** 2012. Mighty Mutualisms: the nature of plant-pollinator interactions. Nature Education Knowledge **3**, 37.

**Lawrence, S.D., Novak, N.G.,** 2006. Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle. Biotechnology letters **28**, 593-599.

**Leiss, K.A., Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R., Klinkhamer, P.G.,** 2009. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. Plant Physiol **150**, 1567-1575.

**Leone, M., Keller, M.M., Cerrudo, I., Ballare, C.L.,** 2014. To grow or defend? Low red : far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in Arabidopsis seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. New Phytol **204**, 355-367.

**Levin, D.A.**, 1973. The Role of Trichomes in Plant Defense. *The Quarterly Review of Biology* **48**, 3-15.

**Levitt, J.**, 1980. Responses of plants to environmental stresses, 2d ed. Academic Press, New York.

**Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E., Howe, G.A.**, 2004. The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *The Plant Cell* **16**, 126-143.

**Lins, J.C., van Loon, J.J., Bueno, V.H., Lucas-Barbosa, D., Dicke, M., van Lenteren, J.C.**, 2014. Response of the zoophytophagous predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* to volatiles of uninfested plants and to plants infested by prey or conspecifics. *BioControl* **59**, 707-718.

**Lison, P., Rodrigo, I., Conejero, V.**, 2006. A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant Physiol* **142**, 1329-1339.

**Loreto, F., Fischbach, R.J., Schnitzler, J.P., Ciccioli, P., Brancaleoni, E., Calfapietra, C., Seufert, G.**, 2001. Monoterpene emission and monoterpene synthase activities in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex* L. grown at elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Global Change Biology* **7**, 709-717.

**Lu, S., Xu, R., Jia, J.W., Pang, J., Matsuda, S.P., Chen, X.Y.**, 2002. Cloning and functional characterization of a beta-pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. *Plant Physiol* **130**, 477-486.

**Lucas-Barbosa, D., van Loon, J.J.A., Dicke, M.**, 2011. The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. *Phytochemistry* **72**, 1647-1654.

**Maeda, T., Takabayashi, J., Yano, S., Takafuji, A.,** 2000. Effects of light on the tritrophic interaction between kidney bean plants, two-spotted spider mites and predatory mites, *Amblyseius womersleyi* (Acari: Phytoseiidae). *Exp Appl Acarol* **24**, 415-425.

**Maffei, M.,** 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* **76**, 612-631.

**Mancinelli, A.L., Rossi, F., Moroni, A.,** 1991. Cryptochrome, phytochrome, and anthocyanin production. *Plant Physiol* **96**, 1079-1085.

**Manetas, Y.,** 2003. The importance of being hairy: the adverse effects of hair removal on stem photosynthesis of *Verbascum speciosum* are due to solar UV-B radiation. *New Phytologist* **158**, 503-508.

**Mantyla, E., Alessio, G.A., Blande, J.D., Heijari, J., Holopainen, J.K., Laaksonen, T., Piirtola, P., Klemola, T.,** 2008. From plants to birds: higher avian predation rates in trees responding to insect herbivory. *PLoS One* **3**, e2832.

**Mattson Jr, W.J.,** 1980. Herbivory in Relation to Plant Nitrogen Content. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**, 119-161.

**Mazza, C.A., Ballare, C.L.,** 2015. Photoreceptors UVR8 and phytochrome B cooperate to optimize plant growth and defense in patchy canopies. *New Phytol* **207**, 4-9.

**McGuire, R., Agrawal, A.A.,** 2005. Trade-offs between the shade-avoidance response and plant resistance to herbivores? Tests with mutant *Cucumis sativus*. *Functional Ecology* **19**, 1025-1031.

**Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., Howe, G.A., He, S.Y., 2008.** A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J* **55**, 979-988.

**Metlen, K.L., Aschehoug, E.T., Callaway, R.M., 2009.** Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. *Plant Cell Environ* **32**, 641-653.

**Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., Wasternack, C., 2008.** Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol* **177**, 114-127.

**Mithofer, A., Boland, W., Maffei, M.E., 2009.** Chemical ecology of plant–insect interactions, In: Wiley-Blackwell (Ed.), *ANNUAL PLANT REVIEWS-Molecular Aspects of Plant Disease Resistance*, pp. 261-280.

**Moreno, J.E., Tao, Y., Chory, J., Ballare, C.L., 2009.** Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4935-4940.

**Mosblech, A., Feussner, I., Heilmann, I., 2009.** Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* **47**, 511-517.

**Muir, C.D., Hangarter, R.P., Moyle, L.C., Davis, P.A., 2014.** Morphological and anatomical determinants of mesophyll conductance in wild relatives of tomato (*Solanum* sect. *Lycopersicon*, sect. *Lycopersicoides*; *Solanaceae*). *Plant Cell Environ* **37**, 1415-1426.

**Mumm, R., Dicke, M.**, 2010. Variation in natural plant products and the attraction of bodyguards involved in indirect plant defense. *Canadian Journal of Zoology* **88**, 628-667.

**Myers, J.H.**, 1991. Thorns, spines, prickles and hairs: are they stimulated by herbivory and do they deter herbivores? Phytochemical induction by herbivores, 325-344.

**Negre, F., Kish, C.M., Boatright, J., Underwood, B., Shibuya, K., Wagner, C., Clark, D.G., Dudareva, N.**, 2003. Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers. *Plant Cell* **15**, 2992-3006.

**Niinemets, Ü., Kännaste, A., Copolovici, L.**, 2013. Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in Plant Science* **4**, 262.

**Niinemets, Ü., Reichstein, M.**, 2003. Controls on the emission of plant volatiles through stomata: Differential sensitivity of emission rates to stomatal closure explained. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* **108**, n/a-n/a.

**Nishida, N., Tamotsu, S., Nagata, N., Saito, C., Sakai, A.**, 2005. Allelopathic Effects of Volatile Monoterpenoids Produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of Cell Proliferation and DNA Synthesis in the Root Apical Meristem of *Brassica campestris* Seedlings. *Journal of Chemical Ecology* **31**, 1187-1203.

**Nonomura, T., Xu, L., Wada, M., Kawamura, S., Miyajima, T., Nishitomi, A., Kakutani, K., Takikawa, Y., Matsuda, Y., Toyoda, H.**, 2009. Trichome exudates of *Lycopersicon pennellii* form a chemical barrier to suppress leaf-surface germination of *Oidium neolycopersici* conidia. *Plant Science* **176**, 31-37.

**Owen, S., Harley, P., Guenther, A., Hewitt, C.**, 2002a. Light dependency of VOC emissions from selected Mediterranean plant species. *Atmospheric Environment* **36**, 3147-3159.

- Owen, S.M., Harley, P., Guenther, A., Hewitt, C.N.**, 2002b. Light dependency of VOC emissions from selected Mediterranean plant species. *Atmospheric Environment* **36**, 3147-3159.
- Ozawa, R., Arimura, G., Takabayashi, J., Shimoda, T., Nishioka, T.**, 2000. Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant Cell Physiol* **41**, 391-398.
- Paré, P.W., Tumlinson, J.H.**, 1999. Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. *Plant Physiology* **121**, 325-332.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., Feyereisen, R.**, 2002. A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* **31**, 1-12.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Perez, A.C., Chico, J.M., Bossche, R.V., Sewell, J., Gil, E., Garcia-Casado, G., Witters, E., Inze, D., Long, J.A., De Jaeger, G., Solano, R., Goossens, A.**, 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**, 788-791.
- Pauwels, L., Goossens, A.**, 2011. The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**, 3089-3100.
- Pazouki, L., Niinemets, U.**, 2016. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. *Front Plant Sci* **7**, 1019.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A.**, 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**, 895-897.

- Peiffer, M., Tooker, J.F., Luthe, D.S., Felton, G.W.**, 2009. Plants on early alert: glandular trichomes as sensors for insect herbivores. *New Phytol* **184**, 644-656.
- Pennings, S.C., Carefoot, T.H., Siska, E.L., Chase, M.E., Page, T.A.**, 1998. FEEDING PREFERENCES OF A GENERALIST SALT-MARSH CRAB: RELATIVE IMPORTANCE OF MULTIPLE PLANT TRAITS. *Ecology* **79**, 1968-1979.
- Pichersky, E., Gershenzon, J.**, 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 237-243.
- Pichersky, E., Raguso, R.A.**, 2016. Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytol*.
- Pierik, R., Ballare, C.L., Dicke, M.**, 2014. Ecology of plant volatiles: taking a plant community perspective. *Plant Cell Environ* **37**, 1845-1853.
- Pierik, R., de Wit, M.**, 2014. Shade avoidance: phytochrome signalling and other aboveground neighbour detection cues. *J Exp Bot* **65**, 2815-2824.
- Pieruschka, R., Poorter, H.**, 2012. Phenotyping plants: genes, phenes and machines. *Functional Plant Biology* **39**, 813-820.
- Pieterse, C.M.**, 2012. Prime time for transgenerational defense. *Plant Physiol* **158**, 545.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.**, 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**, 308-316.

**Ponzio, C., Gols, R., Pieterse, C.M., Dicke, M.,** 2013. Ecological and phytohormonal aspects of plant volatile emission in response to single and dual infestations with herbivores and phytopathogens. *Functional Ecology* **27**, 587-598.

**Poorter, H., Niinemets, U., Poorter, L., Wright, I.J., Villar, R.,** 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytol* **182**, 565-588.

**Pratt, L.H., Cordonnier-Pratt, M.M., Kelmenson, P.M., Lazarova, G.I., Kubota, T., Alba, R.M.,** 1997. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant, Cell & Environment* **20**, 672-677.

**Raguso, R.A.,** 2008. Start making scents: the challenge of integrating chemistry into pollination ecology. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **128**, 196-207.

**Rasmann, S., Agrawal, A.A.,** 2008. In defense of roots: a research agenda for studying plant resistance to belowground herbivory. *Plant Physiol* **146**, 875-880.

**Rasmann, S., Köllner, T.G., Degenhardt, J., Hiltpold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J., Turlings, T.C.J.,** 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* **434**, 732.

**Reinhard, J., Srinivasan, M.V., Zhang, S.,** 2004. Olfaction: scent-triggered navigation in honeybees. *Nature* **427**, 411.

**Richter, A., Schaff, C., Zhang, Z., Lipka, A.E., Tian, F., Kollner, T.G., Schnee, C., Preiss, S., Irmisch, S., Jander, G., Boland, W., Gershenzon, J., Buckler, E.S., Degenhardt, J.,** 2016. Characterization of Biosynthetic Pathways for the Production of the Volatile Homoterpenes DMNT and TMTT in *Zea mays*. *Plant Cell* **28**, 2651-2665.



**Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schafer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., Ulm, R., 2011.**

Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* **332**, 103-106.

**Robbins, C.T., 1993.** Wildlife Feeding and Nutrition. Academic Press, San Diego.

**Robson, F., Okamoto, H., Patrick, E., Harris, S.-R., Wasternack, C., Brearley, C., Turner, J.G., 2010.** Jasmonate and Phytochrome A Signaling in Arabidopsis Wound and Shade Responses Are Integrated through JAZ1 Stability. *The Plant Cell* **22**, 1143-1160.

**Rockwell, N.C., Lagarias, J.C., 2006.** The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *Plant Cell* **18**, 4-14.

**Rosenkranz, M., Schnitzler, J.-P., 2001.** Plant Volatiles, eLS. John Wiley & Sons, Ltd.

**Rosenstiel, T.N., Potosnak, M.J., Griffin, K.L., Fall, R., Monson, R.K., 2003.** Increased CO<sub>2</sub> uncouples growth from isoprene emission in an agriforest ecosystem. *Nature* **421**, 256.

**Runyon, J.B., Mescher, M.C., De Moraes, C.M., 2006.** Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. *Science* **313**, 1964-1967.

**Ryan, C.A., 1990.** Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 425-449.

**Sastry, A., Barua, D., 2017.** Leaf thermotolerance in tropical trees from a seasonally dry climate varies along the slow-fast resource acquisition spectrum. *Scientific Reports* **7**, 11246.

**Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M.A., Schuurink, R.C., 2013.** Green leaf volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *International journal of molecular sciences* **14**, 17781-17811.

**Scranton, K., Stavrinides, M., Mills, N.J., de Valpine, P., 2013.** Small-scale intraspecific life history variation in herbivorous spider mites (*Tetranychus pacificus*) is associated with host plant cultivar. *PLoS One* **8**, e72980.

**Schaller, A., 2008.** Induced Plant Resistance to Herbivory.

**Schilmiller, A., Shi, F., Kim, J., Charbonneau, A.L., Holmes, D., Daniel Jones, A., Last, R.L., 2010.** Mass spectrometry screening reveals widespread diversity in trichome specialized metabolites of tomato chromosomal substitution lines. *Plant J* **62**, 391-403.

**Schoonhoven, L.M., Loon, J.J.A.v., Dicke, M., 2005.** Insect-plant biology, 2nd ed. Oxford University Press, New York.

**Schuh, G., Heiden, A., Hoffmann, T., Kahl, J., Rockel, P., Rudolph, J., Wildt, J., 1997.** Emissions of volatile organic compounds from sunflower and beech: dependence on temperature and light intensity. *Journal of Atmospheric Chemistry* **27**, 291-318.

**Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A., Zheng, N., 2010.** Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**, 400-405.

**Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C.L., Cooke, T.F., Sheard, L.B., Moreno, J.E., Katsir, L., Zheng, N., Browse, J., Howe, G.A., 2012.** JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**, 536-550.

**Silva, D.B., Weldegergis, B.T., Van Loon, J.J., Bueno, V.H.,** 2017. Qualitative and Quantitative Differences in Herbivore-Induced Plant Volatile Blends from Tomato Plants Infested by Either *Tuta absoluta* or *Bemisia tabaci*. *J Chem Ecol* **43**, 53-65.

**Simmons, A.T., Gurr, G.M.,** 2004. Trichome-based host plant resistance of *Lycopersicon* species and the biocontrol agent *Mallada signata*: are they compatible? *Entomologia Experimentalis et Applicata* **113**, 95-101.

**Smakowska, E., Kong, J., Busch, W., Belkhadir, Y.,** 2016. Organ-specific regulation of growth-defense tradeoffs by plants. *Current opinion in plant biology* **29**, 129-137.

**Smith, H.,** 1995. Physiological and Ecological Function within the Phytochrome Family. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 289-315.

**Smith, H.,** 2000. Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585-591.

**Spoel, S.H., Dong, X.,** 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol* **12**, 89-100.

**Stamp, N.E., Yang, Y.,** 1996. Response of Insect Herbivores to Multiple Allelochemicals Under Different Thermal Regimes. *Ecology* **77**, 1088-1102.

**Staswick, P.E.,** 2009. The Tryptophan Conjugates of Jasmonic and Indole-3-Acetic Acids Are Endogenous Auxin Inhibitors. *Plant Physiol* **150**, 1310-1321.

**Staswick, P.E., Tiryaki, I.,** 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2117-2127.

**Staudt, M., Bertin, N.**, 1998. Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves. *Plant, Cell & Environment* **21**, 385-395.

**Stenhouse, D.**, 1974. The evolution of intelligence: A general theory and some of its implications. Barnes & Noble Books.

**Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., Wasternack, C.**, 2003. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**, 895-911.

**Strauss, S.Y., Agrawal, A.A.**, 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol Evol* **14**, 179-185.

**Taiz, L., Zeiger, E.**, 2002. *Plant Physiology*, Third Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

**Takabayashi, J., Dicke, M., Posthumus, M.A.**, 1994. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: Variation caused by biotic and abiotic factors. *J Chem Ecol* **20**, 1329-1354.

**Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballare, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P., Chory, J.**, 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**, 164-176.

**Textor, S., Gershenzon, J.**, 2009. Herbivore induction of the glucosinolate–myrosinase defense system: major trends, biochemical bases and ecological significance. *Phytochemistry Reviews* **8**, 149-170.

**Thaler, J.S., Fidantsef, A.L., Duffey, S.S., Bostock, R.M.,** 1999. Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology* **25**, 1597-1609.

**Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., Browse, J.,** 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665.

**Tian, D., Tooker, J., Peiffer, M., Chung, S.H., Felton, G.W.,** 2012. Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta* **236**, 1053-1066.

**Traw, M.B., Bergelson, J.,** 2003. Interactive Effects of Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Gibberellin on Induction of Trichomes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **133**, 1367-1375.

**Trewavas, A.,** 2005a. Green plants as intelligent organisms. *Trends Plant Sci* **10**, 413-419.

**Trewavas, A.,** 2005b. Plant intelligence. *Naturwissenschaften* **92**, 401-413.

**Trewavas, A.J.,** 2014. Plant behaviour and intelligence. Oxford University Press, Oxford.

**Turlings, T.C., Erb, M.,** 2018. Tritrophic Interactions Mediated by Herbivore-Induced Plant Volatiles: Mechanisms, Ecological Relevance, and Application Potential. *Annual Review of Entomology* **63**.

**Turlings, T.C., Tumlinson, J.H., Lewis, W.J.,** 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**, 1251-1253.

**Ueda, H., Kikuta, Y., Matsuda, K.,** 2012. Plant communication: mediated by individual or blended VOCs? *Plant signaling & behavior* **7**, 222-226.

**Van Haren, R., Steenhuis, M., Sabelis, M., De Ponti, O.d.,** 1987. Tomato stem trichomes and dispersal success of *Phytoseiulus persimilis* relative to its prey *Tetranychus urticae*. *Experimental and Applied Acarology* **3**, 115-121.

**Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castanera, P., Sanchez-Serrano, J.J.,** 2001. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8139-8144.

**Vet, L., Dicke, M.,** 1992. Ecology of Infochemical Use by Natural Enemies in a Tritrophic Context.

**von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K., Keller, B.,** 2002. The Arabidopsis male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* **216**, 187-192.

**War, A.R., Sharma, H.C., Paulraj, M.G., War, M.Y., Ignacimuthu, S.,** 2011. Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. *Plant Signal Behav* **6**, 1973-1978.

**Wasternack, C.,** 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**, 681-697.

**Weldegergis, B.T., Zhu, F., Poelman, E.H., Dicke, M.,** 2015. Drought stress affects plant metabolites and herbivore preference but not host location by its parasitoids. *Oecologia* **177**, 701-713.

**Weller, J.L., Schreuder, M.E., Smith, H., Koornneef, M., Kendrick, R.E.,** 2000. Physiological interactions of phytochromes A, B1 and B2 in the control of development in tomato. *Plant J* **24**, 345-356.

**Wenke, K., Kai, M., Piechulla, B.,** 2010. Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta* **231**, 499-506.

**Widhalm, J.R., Jaini, R., Morgan, J.A., Dudareva, N.,** 2015. Rethinking how volatiles are released from plant cells. *Trends Plant Sci* **20**, 545-550.

**Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L.,** 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* **58**, 109-130.

**Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J.G.,** 1998. COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.

**Xie, X.-Z., Xue, Y.-J., Zhou, J.-J., Zhang, B., Chang, H., Takano, M.,** 2011. Phytochromes Regulate SA and JA Signaling Pathways in Rice and Are Required for Developmentally Controlled Resistance to *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant* **4**, 688-696.

**Yamaura, T., Tanaka, S., Tabata, M.,** 1989. Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. *Phytochemistry* **28**, 741-744.

**Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., Xie, D.,** 2009. The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* **21**, 2220-2236.

**Yan, L., Zhai, Q., Wei, J., Li, S., Wang, B., Huang, T., Du, M., Sun, J., Kang, L., Li, C.B., Li, C.,** 2013a. Role of tomato lipoxygenase D in wound-induced

jasmonate biosynthesis and plant immunity to insect herbivores. PLoS Genet **9**, e1003964.

**Yan, Y., Borrego, E., Kolomiets, M.V.**, 2013b. Jasmonate Biosynthesis, Perception and Function in Plant Development and Stress Responses, In: Baez, R.V. (Ed.), Lipid Metabolism. InTech, Rijeka, p. Ch. 16.

**Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., Farmer, E.E.**, 2007. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. Plant Cell **19**, 2470-2483.

**Yoshinaga, N., Alborn, H.T., Nakanishi, T., Suckling, D.M., Nishida, R., Tumlinson, J.H., Mori, N.**, 2010. Fatty Acid-amino Acid Conjugates Diversification in Lepidopteran Caterpillars. Journal of Chemical Ecology **36**, 319-325.

**Zeng, L., Wang, X., Kang, M., Dong, F., Yang, Z.**, 2017. Regulation of the Rhythmic Emission of Plant Volatiles by the Circadian Clock. International journal of molecular sciences **18**, 2408.

**Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Harper, J.W., Pavletich, N.P.**, 2002. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. Nature **416**, 703-709.

**Ziegler, M.**, 2000. New functions of a long-known molecule. European Journal of Biochemistry **267**, 1550-1564.